

Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen:
Identifizierung neuer Kandidatengene
und Evaluierung der Rolle von DKK1

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Eva Maria Gosepath
aus Gladbeck

Bonn 2007

Die vorliegende Dissertationsschrift wurde mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn in der Zeit von Juli 2002 bis Januar 2007 in der Abteilung Pharmazeutische Chemie des Pharmazeutischen Institutes Endenich der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter Leitung von Prof. Dr. Matthias U. Kassack angefertigt.

Erstgutachter (Betreuer): Prof. Dr. Matthias U. Kassack

Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Wiese

Fachnahes Mitglied: Prof. Dr. Ulrich Jaehde

Fachangrenzendes Mitglied: PD Dr. Hans A. Vaupel

Tag der Disputation: 25.04.2007

*Was wir wissen, ist ein Tropfen,
was wir nicht wissen – ein Ozean.*

Isaac Newton

1	Einleitung	1
1.1	Kopf-Hals-Tumore	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Ursachen	1
1.1.3	Epidemiologie	2
1.2	Cisplatin	5
1.2.1	Zufällige Entdeckung der biologischen Aktivität von Cisplatin	5
1.2.2	Chemotherapie mit Cisplatin: Erfolge und ihre Grenzen	5
1.2.3	Wirkmechanismus von Cisplatin	7
1.2.4	Reparaturmechanismen Cisplatin-geschädigter DNA	9
1.2.5	Cisplatin-Resistenz	12
1.3	Differentielle Genexpressionsanalyse	15
1.3.1	Überblick	15
1.3.2	Suppressive subtraktive Hybridisierung	15
2	Zielsetzung	20
3	Material und Methoden	21
3.1	Materialien	21
3.1.1	Reagenzien und Chemikalien	21
3.1.2	Puffer und Lösungen	24
3.1.3	Verwendete Kits	32
3.2	Zellkultur	33
3.2.1	Zelllinien und Zellkulturmedien	33
3.2.2	Durchführung der Zellkultur	36
3.2.3	Etablierung einer Cisplatin-resistenten Subzelllinie	38
3.3	MTT-Test	39
3.3.1	Überblick und Durchführung des MTT-Tests	39
3.3.2	Bestimmung des Resistenzgrades Cisplatin-resistenter Zelllinien	43
3.4	Sulforhodamin-Färbung	44
3.5	BrdU-Test	46
3.6	Cisplatin-Aufnahme der Zellen	49
3.7	Nukleinsäuren	50
3.7.1	Aufbau der Nukleinsäuren	50
3.7.2	RNA-Isolierung	54

3.7.3	Isolierung der Poly(A ⁺)-mRNA	57
3.7.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren	58
3.7.5	Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	60
3.7.6	Alkoholfällung von Nukleinsäuren	65
3.8	Quantitative <i>Real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)	66
3.8.1	cDNA-Synthese	66
3.8.2	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	67
3.8.3	Primer	70
3.8.4	<i>Real-Time</i> PCR	73
3.8.5	<i>Housekeeping</i> -Gene	77
3.8.6	Relative Quantifizierung der RT-PCR	80
3.9	Suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)	82
3.9.1	Zellkulturbedingungen und mRNA-Isolierung für die SSH	83
3.9.2	Allgemeines zur SSH	83
3.9.3	Synthese des ersten cDNA-Stranges	86
3.9.4	Synthese des zweiten cDNA-Stranges	87
3.9.5	Verdau der cDNA	89
3.9.6	Kontrolle des RsaI-Verdau	91
3.9.7	Adapterligation	95
3.9.8	Kontrolle der Adapterligation	97
3.9.9	Erste Hybridisierung	100
3.9.10	Zweite Hybridisierung	102
3.9.11	PCR-Amplifikation	104
3.10	Eliminierung von falsch-positiven Sequenzen der SSH	108
3.10.1	Auftreten von falsch-positivem Hintergrund während der SSH	108
3.10.2	Eliminierung von Typ-II-Hintergrund der SSH	111
3.10.3	Isolierung der PCR-Produkte aus der SSH	117
3.10.4	Differentielles Screening der PCR-Produkte aus der SSH	122
3.10.5	Sequenzierung und Identifizierung differentiell exprimierter Fragmente	133
3.11	Untersuchung der Genexpression an 18 Zelllinien	134
3.11.1	Cisplatin-Resistenzgrad aller untersuchten Zelllinien	134
3.11.2	Probengewinnung	134
3.11.3	geNorm-Auswertung der qRT-PCR	135
3.11.4	NormIt-Auswertung der qRT-PCR	140
3.12	Überexpression von DKK1	146

3.12.1	Überblick	146
3.12.2	Bakterien-Stocks und Plasmidisolierung	146
3.12.3	Insert-Isolierung mittels <i>Proof Reading</i> -PCR	147
3.12.4	Optimierung und Durchführung der DKK1-Insert-Isolierung mittels PCR	149
3.12.5	Quantifizierung der PCR-Produkte	151
3.12.6	Glasmilch-Aufreinigung der PCR-Fragmente	152
3.12.7	Restriktion des Vektors und der Inserts	153
3.12.8	Aufreinigung der Restriktionsansätze über Kristallviolett- Agarosegele	154
3.12.9	Ligation des Vektors, Vermehrung und Isolierung	155
3.13	Transfektion und Expression von DKK1	157
3.13.1	Optimierung der Transfektion	157
3.13.2	Geneticin-Selektion transfizierter Zellen	160
3.13.3	Klonale Selektion	161
3.13.4	PCR-Selektion der Klone	162
3.14	DKK1-ELISA	164
3.14.1	Durchführung des DKK1-ELISA	164
3.14.2	Standardisierung des DKK1-ELISA	166
3.15	Beeinflussung des WNT-Signalweges	167
3.15.1	(2'Z,3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxim	167
3.15.2	1-Azakenpaullon	167
3.15.3	DKK1	168
3.15.4	DKK1-Antikörper	168
4	Ergebnisse	169
4.1	Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien	169
4.1.1	Etablierung der Zelllinie Cal27res	169
4.1.2	MTT-Test	169
4.1.3	BrdU-Test	174
4.1.4	Zusammenfassung der MTT-, BrdU- und SRB-Daten	177
4.1.5	Cisplatin-Aufnahme	178
4.2	Differentielle Genexpressionsanalyse von Cal27 und Cal27res	179
4.2.1	Eliminierung falsch-positiver Fragmente der SSH	179
4.2.2	Sequenzierungsergebnisse	183
4.2.3	qRT-PCR-Bestätigung der Kandidatengene	185

4.3	Evaluierung der Kandidatengene und weiterer interessanter Gene an weiteren Zelllinien	187
4.3.1	Ermittlung der Cisplatin-Resistenz verschiedener Zelllinien	187
4.3.2	Expression der durch SSH identifizierte Kandidatengene und weiterer interessanter Gene in verschiedenen Zelllinien	189
4.3.3	Vergleich der Expressionsdaten	228
4.4	DKK1-Sekretion von Cal27-Zelllinien	237
4.4.1	Etablierung eines DKK1-ELISA	237
4.4.2	DKK1-Sekretion von Cal27 und Cal27cis	238
4.4.3	Stressbedingte DKK1-Sezernierung in Cal27-Zelllinien	240
4.4.4	Pharmakologische Beeinflussung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges	249
4.5	DKK1-Überexpressionsklone	253
4.5.1	Sequenzierung der Plasmide	253
4.5.2	PCR-Selektion	253
4.5.3	DKK1-Expression von Cal27-DKK1 und Cal27res-DKK1	255
4.5.4	Cisplatin-Sensitivität der DKK1-Klone: MTT-Test	256
4.5.5	Cisplatin-Sensitivität der DKK1-Klone: BrdU-Test	257
4.5.6	Vergleich der MTT- und BrdU-Daten der Klone	258
5	Diskussion	259
5.1	Etablierung der Cisplatin-resistenten Subzelllinie Cal27res und ihr Vergleich zu Cal27	259
5.2	Expression der Kandidatengene in Tumorzelllinien	261
5.2.1	Aldo-Keto-Reduktasen	261
5.2.2	Proteolytische Enzyme und ihre Gegenspieler	265
5.2.3	Der Tumorsuppressor p53	269
5.2.4	Thrombospondin-1	273
5.2.5	Ribosomale Proteine	278
5.2.6	<i>Early growth response 1</i> (EGR1)	281
5.3	Das Kandidatengene Dickkopf 1 (DKK1)	283
6	Zusammenfassung	290
7	Abstract	293
8	Abkürzungsverzeichnis	295

9	Literaturverzeichnis	298
10	Veröffentlichungen	315
11	Danksagung	316
12	Anhang	317
12.1	Primersequenzen und Accession-Nummern	317
12.2	Cisplatin-Resistenz 18 verschiedener Tumorzelllinien	319
12.3	Genexpression der 18 Zelllinien	328
12.3.1	geNorm	328
12.3.2	Vergleich der Zellpärchen	334
12.3.3	NormIt	338
12.4	Vektorkarten	345
12.4.1	pCR [®] 2.1-TOPO [®]	345
12.4.2	pcDNA3.1	346
12.5	Genotypen der verwendeten E. coli	347
13	Curriculum vitae	349

1 Einleitung

1.1 Kopf-Hals-Tumore

1.1.1 Definition

Unter Kopf-Hals-Tumoren versteht man tumorartige Erkrankungen, die sich im Mund-Nasen-Rachenraum sowie im Hals entwickeln. Dazu gehören Tumore der Lippen und der Zunge, des Mundbodens und der -höhle, des Zahnfleisches, Gaumens, Rachens, Kehlkopfes, der Speicheldrüsen, der Nasenhöhle und -nebenhöhlen und des Mittelohres. Die überwiegende Zahl der Kopf-Hals-Tumore sind morphologisch gesehen Plattenepithelkarzinome. Die Lebensqualität der Patienten bei Kopf-Hals-Tumoren ist oft erheblich beeinträchtigt. Meist handelt es sich um schwerwiegende Komplikationen wie Sprechbehinderungen und eine eingeschränkte Atmung, die sowohl erkrankungs- als auch behandlungsbedingt auftreten können, oder Kau- und Schluckstörungen und hieraus folgend Probleme beim Essen.

1.1.2 Ursachen

Jedes Individuum hat eine genetisch determinierte, individuelle Schwelle der Empfänglichkeit für Krebserkrankungen, jedoch spielen die im Folgenden beschriebenen, zumeist vermeidbaren Risikofaktoren die auslösende Rolle.

Als eine Ursache für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren ist **Tabakkonsum** unumstritten. Die Art des Tabakkonsums (Kautabak, Pfeifen-, Zigarren- oder Zigarettentabak) kann dabei unterschiedliche Tumore begünstigen. Besonders Lippenkarzinome werden auch durch verstärkte, kumulierende **UV-Exposition** begünstigt.¹

Inzwischen wird auch ein gesteigerter **Alkoholkonsum** als Risikofaktor für Kopf-Hals-Tumore angesehen.² Laut Viswanathan und Wilson ist ein

gesteigertes Risiko zwar dosisabhängig, aber unabhängig von der Art des Alkohols.³ Tanabe et al. hingegen ziehen den Schluss, dass der Genuss hochprozentiger Getränke das Risiko stärker erhöht als der niedrigprozentiger.⁴

Alkohol- und Tabakkonsum zusammen wirken in der Induktion von Tumoren synergistisch. Alkohol erhöht die Permeabilität der Mundschleimhaut durch Herauslösen von extrazellulären Lipiden, so dass tabakassoziierte Karzinogene leichter eindringen können. Darüber hinaus scheinen auch eine **mangelnde Mundpflege** bzw. scharfrandige Füllungs- und Zahnkanten das Risiko für Mund- und Rachentumore zu fördern, da Läsionen im Zahnfleisch bequeme Eintrittspforten für Karzinogene darstellen.⁵

Auch **Viren** scheinen an der Tumorentstehung beteiligt zu sein. Gillison et al. beobachteten bei 25 % der von ihnen untersuchten Patientenproben eine Infektion mit humanen Papilloma-Viren (HPV).⁶ Ebenfalls wird eine Epstein-Barr-Virusinfektion (EBV) vor allem für Nasen-Rachen-Karzinome verantwortlich gemacht.^{7;8}

1.1.3 Epidemiologie

Da der Oberbegriff Kopf-Hals-Tumor sehr heterogen verwendet wird, ergibt sich eine sehr verschwommene Datenlage zu der Anzahl der Neuerkrankungen. Je nachdem, welche Tumore genau zusammengefasst werden, tritt der Kopf-Hals-Tumor an die Stelle der sechst- bis vierthäufigsten Tumorerkrankung in Deutschland. Einfacher ist die Situation zu beurteilen, wenn man sich den Bericht des Statistischen Bundesamtes, „Todesursachen in Deutschland 2004“, anschaut.⁹ Danach sind an Tumoren von Lippe, Mundhöhle, Pharynx, Larynx und Trachea im Jahre 2004 in Deutschland 5 988 Menschen gestorben, bezogen auf die Gesamtzahl der Krebstoten sind es 2,9 % (5 988/209 328). Der Männeranteil lag bei 80,3 % (4 811/5 988). In Abbildung 1.1 ist die Verteilung der Krebstoten nach Geschlechtern getrennt aufgeschlüsselt.

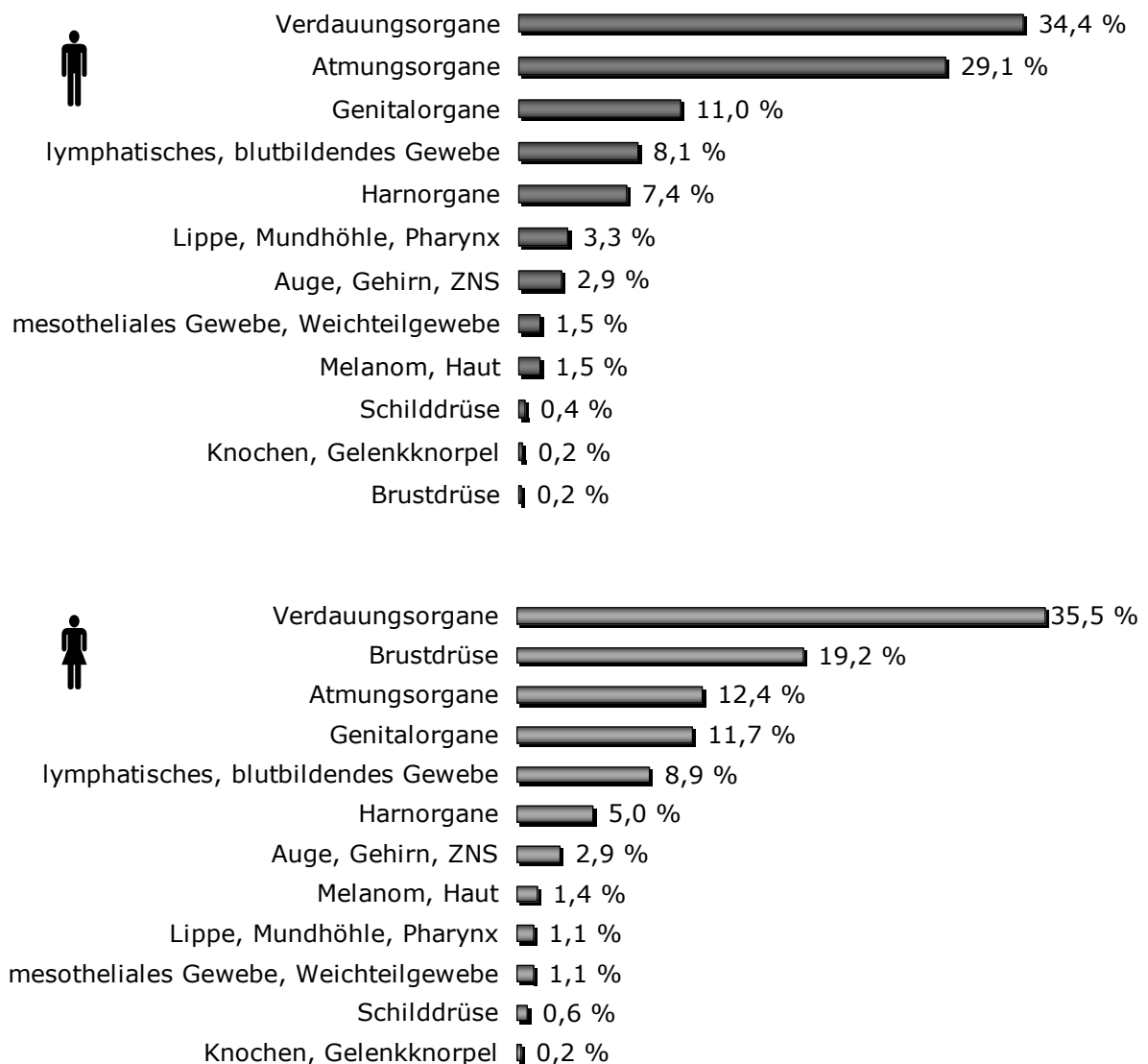


Abbildung 1.1: Prozentuale Verteilung der bösartigen Krebserkrankungen bei den Krebstoten in Deutschland 2004, Quelle: Statistisches Bundesamt „Todesursachen in Deutschland 2004“.⁹

Schlesinger-Raab et al. beschreiben Zahlen aus dem Jahr 1998 für Deutschland, geschätzt anhand des Saarländischen Krebsregisters; danach machten Malignome des Kopf-Hals-Bereichs bei Männern einen Anteil von 6,3 % aller jährlichen Krebsneuerkrankungen aus und standen damit an vierthäufigster Stelle der Häufigkeitsverteilung für Malignome. Die Krebs-Mortalität der Kopf-Hals-Tumore bei Männern betrug knapp 5 %. Unter den Frauen erkrankten 2,1 % an Kopf-Hals-Tumoren mit einer Mortalität von 1,2 %. Zu bemerken ist, dass sich die Morbidität in den

letzten 20 Jahren fast verdreifacht hat, was bei keiner anderen Krebserkrankung zu beobachten ist.¹⁰

Auffallend ist auch, dass die Patienten, die an Kopf-Hals-Tumoren erkranken, im Schnitt mit 65 Jahren und damit etwa 10 Jahre eher sterben als die Gesamtheit der Krebstoten, die etwa mit 75 Jahren ihrem Leiden erliegen (siehe Abbildung 1.2).

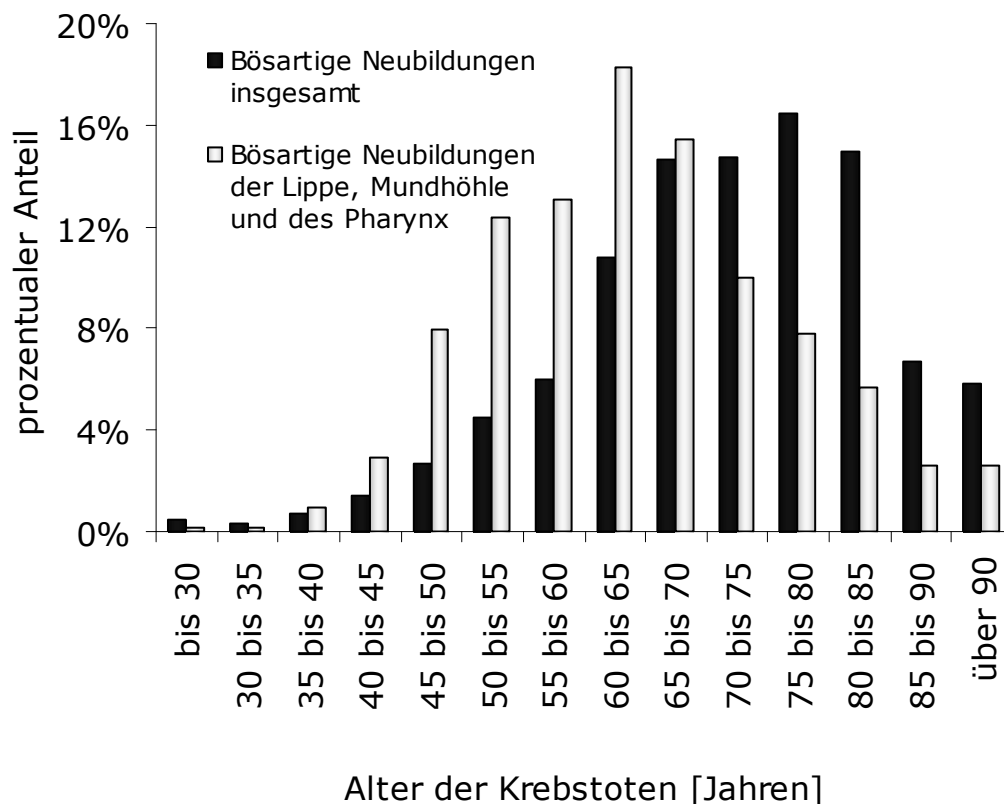


Abbildung 1.2: Sterbefälle von Lippen-, Mundhöhlen- und Pharynx-Tumoren im Vergleich zu bösartigen Neubildungen insgesamt in Abhängigkeit vom Alter, Quelle: Statistisches Bundesamt „Todesursachen in Deutschland 2004“.⁹

1.2 Cisplatin

1.2.1 Zufällige Entdeckung der biologischen Aktivität von Cisplatin

In den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts entdeckte Barnett Rosenberg zufälligerweise die zytotoxische Aktivität von Cisplatin. Er untersuchte den Einfluss eines elektrischen Feldes auf das Wachstum des Darmbakteriums *Escherichia coli*. Dazu beobachtete er die Bakterienkultur in Ammoniumchlorid-haltigem Nährmedium und legte mittels einer Platinelektrode eine Spannung an. Dies hatte zur Folge, dass die Bakterien bis zu 300fach länger als normal in die Länge wuchsen, aber die Teilung unterblieb.^{11;12} Rosenberg erkannte, dass nicht der elektrische Strom selbst für diesen biologischen Effekt verantwortlich war, sondern das durch Oxidation der Platinelektrode gebildete Cisplatin.¹³ Kurze Zeit später vermutete er in Platinkomplexen eine neue Klasse potenter Antitumor-Wirkstoffe.¹⁴ Platinkomplexe waren jedoch keine neuen Verbindungen. Cisplatin wurde bereits 1844 von Michele Peyronne synthetisiert. Daher war dieser Komplex lange unter dem Namen Peyrones Salz bekannt. Letztendlich in die Antitumor-Therapie eingeführt wurde Cisplatin Ende der 70er Jahre des 20. Jahrhunderts.¹⁵⁻¹⁷

1.2.2 Chemotherapie mit Cisplatin: Erfolge und ihre Grenzen

Cisplatin ist inzwischen ein weit verbreitetes und effektives Chemotherapeutikum in der Behandlung epithelialer Tumore wie Lungen-, Kopf-Hals-, Ovarial-, Blasen- und Hodenkrebs. Besonders Hodenkrebs, der vor der Cisplatin-haltigen Chemotherapie ein Todesurteil bedeutete, ist heute selbst bei metastasierenden Tumoren in 80 % der Fälle heilbar, bei Patienten mit guten Prognosen werden Heilungsraten von mehr als 90 % erreicht.¹⁸ Bei der Krebstherapie im Kopf-Halsbereich sind die Ziele der Behandlung - je nach Stadium der Tumorerkrankung - die komplette Tumorkontrolle und Heilung sowie ein gutes funktionelles und ästhetisches

Ergebnis durch die plastisch-chirurgische Wiederherstellung der oropharyngealen Funktion. Als kurative Methode der Wahl gilt für fast alle Kopf-Hals-Tumore die radikale chirurgische Resektion. Das Problem dabei ist allerdings, dass aus anatomischen Gründen oft nicht der komplette Tumor entfernt werden kann. In fortgeschrittenem Tumorstadium ist daher eine zusätzliche Strahlen- und/oder Chemotherapie unumgänglich. Die antineoplastische Chemotherapie ist hier von Bedeutung bei rezidivierenden oder fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren sowie bei Fernmetastasen. Gute Wirksamkeit gegen das Plattenepithelkarzinom besitzen in der Regel neben Cisplatin auch Carboplatin, Methotrexat und 5-Fluoruracil (5-FU).

Cisplatin und andere in folgenden Jahren entwickelte Platin-Komplexe wirken, indem die Zelle nach Quervernetzung der DNA-Stränge durch Cisplatin die Apoptose, den programmierten Zelltod, einleitet. Sie gehören zur Gruppe der alkylierenden Zytostatika. Die Apoptose ist auch verantwortlich für viele der Nebenwirkungen der Cisplatin-haltigen Chemotherapie wie Ototoxizität oder Nephrotoxizität.^{19;20} Eine Behandlung mit Cisplatin führt in den Zellen nicht nur zu Stressreaktionen aufgrund der DNA-Schäden, sondern auch zu oxidativem Stress und Stress im Endoplasmatischen Retikulum (ER).²¹ Dies zeigt, dass die zelluläre Antwort auf Cisplatin-Behandlung sehr komplex ist.

Eines der größten Probleme in der Chemotherapie ist die Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Chemotherapeutika.²² Bei nicht vorbehandelten Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren können durch Kombination von Cisplatin mit 5-Fluoruracil Vollremissionsraten bis 90 % erreicht werden, bei vorbehandelten Patienten dagegen nur noch bis 50 %, wobei die mediane Remissionsdauer nur bei drei bis acht Monaten liegt. Eine neue Hoffnung für Patienten mit lokal fortgeschrittenen, metastasierenden Kopf-Hals-Tumoren, bei denen eine Chemotherapie nicht mehr anspricht, scheinen EGFR-Inhibitoren wie der monoklonale Antikörper Cetuximab zu sein, da fast 97 % der Kopf-Hals-Tumore EGFR überexprimieren.^{23;24}

1.2.3 Wirkmechanismus von Cisplatin

Membranvorgänge

Das Molekül Cisplatin ist ein so genanntes *Prodrug*. Im Blutplasma und in der extrazellulären Flüssigkeit wird das elektroneutrale Molekül durch die dort vorhandene, hohe Chloridionenkonzentration von mehr als 100 mM stabilisiert. Als ungeladenes Molekül kann es durch Diffusion die Zellmembran passieren oder durch Transport mittels Membranproteinen in das Cytosol gelangen.

Bioaktivierung

Erst nach der Aufnahme in das Cytosol der Zelle durch passive Diffusion oder Transport werden die Chlorliganden abgespalten (siehe Abbildung 1.3) und durch Wassermoleküle ersetzt, so dass ein positiv geladenes Elektrophil entsteht. Erst dieses bioaktivierte Cisplatin ist in der Lage, Addukte mit Nucleophilen auszubilden.

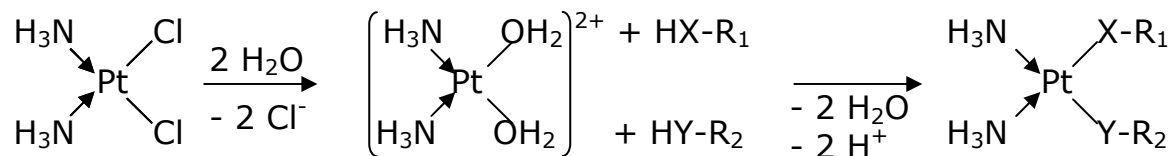


Abbildung 1.3: Bioaktivierung und Reaktionsmechanismus von Cisplatin.

Adduktbildung

Nach der Bioaktivierung reagiert das elektrophile Cisplatin mit nucleophilen Gruppen der DNA, von Proteinen und kleinen Molekülen wie z. B. Glutathion. Es reagiert mit der DNA unter Bildung von Intrastrang- und Interstrangvernetzungen, wodurch bei Interstrangvernetzungen eine Quervernetzung der beiden Stränge entsteht, oder es reagiert erst mit DNA zum Monoaddukt und bindet mit der zweiten Bindungsstelle an Proteine oder andere thiolgruppenhaltige Moleküle. Diese möglichen Addukte sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

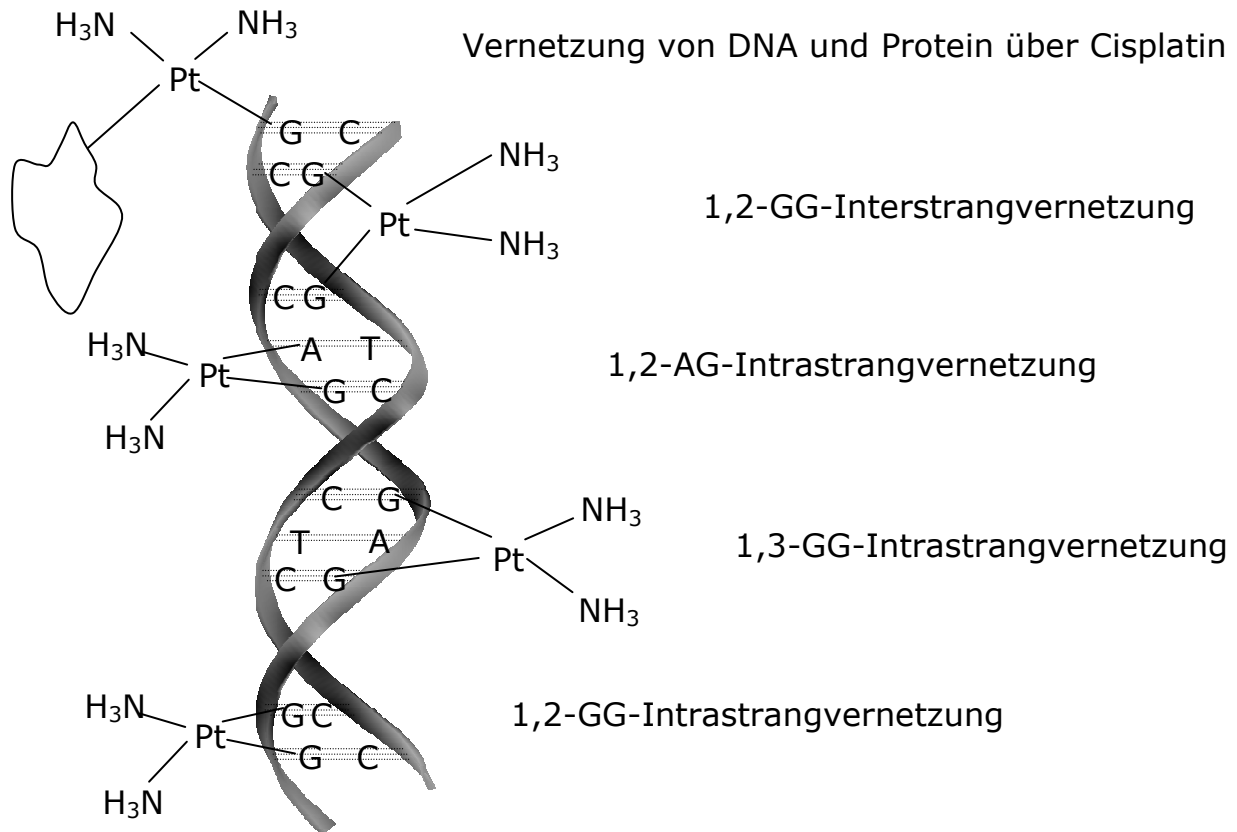


Abbildung 1.4: Mögliche Platin-DNA-Addukte. Neben der Vernetzung von DNA mit Proteinen kommt es zur Ausbildung von Intrastrangvernetzungen, bei denen entweder benachbarte Basen (1,2-Intrastrangvernetzung) oder Basen über ein weiteres Basenpaar hinweg (1,3-Intrastrangvernetzung) eines Stranges über Cisplatin vernetzt werden. Bei 1,2-Interstrangvernetzungen werden beide DNA-Stränge über benachbarte Basenpaare miteinander vernetzt. Dabei codieren die Buchstaben A und G für die Basen Adenin bzw. Guanin, wie z. B. GG in 1,2-GG-Intrastrangvernetzung für die Ausbildung von Platin-Addukten zwischen zwei Guaninen.

Das schwefelhaltige Tripeptid Glutathion (GSH), siehe Abbildung 1.5, ist eines der häufigsten thiolgruppenhaltigen Moleküle der Zelle. Aktiviertes Cisplatin ist sehr reaktiv gegenüber dem Cysteinrest von GSH. Die Bindung von Cisplatin an GSH führt zu dessen rascher Entgiftung. An Glutathion gekoppeltes Cisplatin wird dann aktiv aus der Zelle sezerniert.

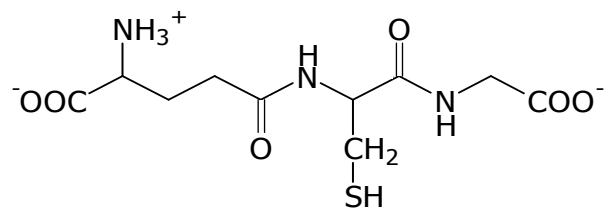


Abbildung 1.5: Formel des Tripeptids Glutathion, zu erkennen sind die drei Aminosäuren Glutaminsäure, Cystein und Glycin.

1.2.4 Reparaturmechanismen Cisplatin-geschädigter DNA

Erkennung von Platin-DNA-Addukten

Die DNA als Träger der genetischen Information kann Addukte mit Nucleophilen ausbilden. Daher hat die Evolution schon früh Reparatursysteme hervorgebracht, um DNA-Schäden erkennen und reparieren zu können und die genetische Stabilität der Zelle zu sichern. Bei einer übermäßigen, irreparablen Schädigung wird im Idealfall die Apoptose, der so genannte programmierte Zelltod, eingeleitet.

DNA-Platin-Addukte inhibieren fundamentale Vorgänge in der Zelle wie die Replikation, Transkription, Translation und die DNA-Reparatur. Sie deformieren die DNA-Doppelhelix so, dass sich die große und kleine Furche in ihrem Ausmaß verändern. Bellon et al. haben dies genauer untersucht und fanden heraus, dass die 1,2-GG- und 1,2-AG-Intrastrangvernetzungen, die etwa 90 % der Platin-DNA-Addukte ausmachen, dazu führen, dass die Doppelhelix um 34° zur großen Furche abgewinkelt und um 13° entwunden wird.²⁵ Durch diese massiven Strukturveränderungen werden Reparaturproteine angezogen, binden an die DNA und leiten die Reparaturprozesse ein.

Reaktion der Zelle auf Platinierung der DNA

Um genügend Zeit für eine effiziente Reparatur zu haben, kommt es als Reaktion auf Cisplatin oft zu einem Zyklusarrest der Zelle. Dabei spielt der Transkriptionsfaktor p53 eine entscheidende Rolle. p53 ist unter normalen Bedingungen instabil und wird schnell Ubiquitin-vermittelt abgebaut. Aufgrund eines DNA-Schadens jedoch wird p53 durch Phosphorylierung in der Zelle stabilisiert und akkumuliert, wodurch die Zelle in den Zyklusarrest geht, um vor einer weiteren Teilung Zeit für die Reparatur des DNA-Schadens (durch die im Folgenden beschriebenen Mechanismen) zu gewinnen. Akkumuliert in der Zelle aufgrund irreparabler DNA-Schäden p53, werden nach Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an die DNA Gene der Bcl2-Familie herunter reguliert, was wiederum über Caspasen die Apoptose induziert.²⁶

Base Excision Repair (BER)

Mittels der *Base Excision*-Reparatur (BER) werden kleine DNA-Schäden repariert. Der erste Schritt ist die Erkennung des Schadens und Entfernung der falschen Base durch eine entsprechende DNA-N-Glykosylase. Dadurch entsteht eine so genannte AP-Site (*abasic*, *apurinic/apyrimidinic* = AP). Manche Glykosylasen besitzen eine Lyase-Aktivität, die das DNA-Rückgrat zwischen P und O in 3'-Position der AP-Site schneidet. Anschließend wird das DNA-Rückgrat in 5'-Position der AP-Site eingeschnitten und es entsteht eine 3'-OH-Gruppe, die einfach durch eine DNA-Polymerase verlängert werden kann. Auch DNA-Polymerasen mit entsprechender Desoxyribose-Phosphatase-Aktivität sind in der Lage, das DNA-Rückgrat in 3'-Position der AP-Site zu schneiden, wenn die Glykosylase es zuvor nicht getan hat. So wird das überzählige 2'-Desoxyribose-5'-Phosphat entfernt und eine Ligase kann den Strang nach Einfügen eines Nukleotids verbinden.

Nucleotide Excision Repair (NER)

Die *Nucleotide Excision*-Reparatur ist der wichtigste Mechanismus zur Reparatur von Cisplatin-DNA-Addukten.²⁷ Es werden zwei verschiedene Arten der *Nucleotide Excision*-Reparatur unterschieden. Der Unterschied besteht jedoch nur in der Erkennung des DNA-Schadens. Mehr als 30 verschiedene Proteine sind an der NER beteiligt.

Zum einen gibt es die ***global genome Nucleotide Excision Repair (GGR)***, durch die Schäden, die das ganze Genom betreffen, repariert werden. Bestimmte Proteine wie das *DNA-damage binding protein* (DDB) kontrollieren sowohl den codierenden als auch den nichtcodierenden Strang des kompletten Genoms und rekrutieren Reparaturproteine, wenn sie Verformungen der DNA-Helix feststellen.

Ein Großteil der Intrastrang-Cisplatin-DNA-Addukte wird mittels der ***transcription-coupled Nucleotide Excision Repair (TCR)*** beseitigt. Dieser Mechanismus erkennt und repariert transkriptionsblockierende Schäden der DNA²⁸ und wird aktiviert, wenn die RNA-Polymerase II auf eine Verformung der DNA-Doppelhelix stößt. Dadurch wird die Transkriptionsmaschinerie gestoppt, was durch einen Komplex von CSB

(*cockayne syndrome group B protein*, auch ERCC6) und XPG (*xeroderma pigmentosum, complementation group G*) erkannt wird. Weitere Reparaturproteine wie XPA (*xeroderma pigmentosum, complementation group A*), TFIIH und CSA (*cockayne syndrome type A*) werden rekrutiert²⁹, ebenso der Komplex aus XPF und ERCC1. Dieses Heterodimer spielt im Folgenden eine entscheidende, da limitierende Rolle. Es agiert als Endonuklease und schneidet den beschädigten DNA-Strang vor dem Schaden in 5'-Position (Incision). Dann wird der beschädigte Strang durch Helikasen wie XPD und XPB entwunden, bevor die Endonuklease XPG (*xeroderma pigmentosum, complementation group G*, auch ERCC5) etwa 24 bis 32 Bp entfernt von dem ersten Einschnitt in 3'-Richtung das schadhafte Einzelstrang-DNA-Stück herausschneidet (Excision). Die DNA-Polymerasen δ und ϵ ersetzen den fehlenden Bereich, indem sie den unbeschädigten, komplementären Strang als Vorlage benutzen. Anschließend wird das 5'-Ende durch die DNA-Ligase I an den Strang ligiert³⁰, bevor die Translation weitergeführt wird.

Zwei Erbkrankheiten, hervorgerufen durch Mutationen im NER-Mechanismus, sind bis heute bekannt. Die so genannten Mondscheinkinder leiden an Xeroderma pigmentosum, einem Defekt der schadenserkennenden XPA-XPG-Familie.³¹ Ihre Haut ist überempfindlich gegenüber ultravioletter Strahlung, was bereits im Kindesalter zu bösartigen Hauttumoren führt. Mutationen in den CSA/B-Genen führen zu dem Cockayne-Syndrom, einer Form der Progerie.³²

Mismatch Repair (MMR)

Das *Mismatch*-Reparatursystem erkennt und repariert sowohl fehlerhafte Basenpaarungen als auch Baseninsertionen und Basendeletionen, die während der DNA-Replikation und DNA-Rekombination auftreten. Das fehlerfreie Arbeiten des MMR-System ist wichtig, denn während der DNA-Synthese treten Fehler nur im neu synthetisierten Strang auf - ein Basenaustausch im parentalen Strang würde einen irreparablen DNA-Schaden zur Folge haben. Der erste Schritt des MMR-Systems ist die Erkennung des DNA-Schadens durch Bindung eines der beiden bekannten Heterodimer-Komplexe hMutS bestehend aus hMSH2 (human MutS Homolog 2) und hMSH6 (human MutS Homolog 6) bzw. hMSH2 und

hMSH3 (human MutS Homolog 3) an die DNA. Die beiden Komplexe unterscheiden sich in ihrer Affinität zu bestimmten DNA-Schäden.³³ Unter ATP-Verbrauch entfernt sich dieser Komplex von dem DNA-Schaden, bis weitere Proteine wie das Heterodimer aus hMLH1 (*human MutL Homolog 1*) und hPMS2 (*human postmeiotic segregation increased 2*) rekrutiert sind, das ebenfalls an den DNA-Protein-Komplex bindet.³⁴ Bei *E. coli* ist geklärt, dass anschließend MutH als Endonuklease benötigt wird, die den neu synthetisierten Tochterstrang aufgrund der noch fehlenden Methylierung erkennt und einschneidet.³⁵ In Eukaryonten ist bisher nicht geklärt, wie dieser Schritt vollzogen wird, es konnte noch kein Homolog zu MutH identifiziert werden. Daher wird vermutet, dass die Strang-Diskriminierung anders als in *E. coli* abläuft.³⁵ Erkenntnisse von Lee und Alani lassen vermuten, dass hier der Transkriptionsfaktors *PCNA* (*proliferating cell nuclear antigen*) eine Rolle spielt.³⁶ Der fehlerhafte Strang wird abgebaut und anschließend von der DNA-Polymerase III (*E. coli*) resynthetisiert. Der verbleibende Strangbruch wird dann durch eine DNA-Ligase geschlossen.

1.2.5 Cisplatin-Resistenz

Die Mechanismen, die zu einer Cisplatin-Resistenz führen, lassen sich in zwei große Gruppen einteilen: Die erste Art Resistenzmechanismen, die **Cisplatin daran hindern, seine Zielstruktur, die DNA, zu erreichen**, geht einher mit einer verminderten Konzentration aktiven Cisplatins in der Tumorzelle. So kann sich die Zelle durch Veränderung ihrer Membran, wie z. B. durch vermehrte Einlagerung von Kollagen vor der passiven Diffusion des Cisplatins in das Zellinnere schützen.³⁷

Eine verminderte Cisplatinkonzentration in der Zelle kann aber auch Folge entweder einer verminderten Aufnahme (Influx) oder einer höheren Ausschleusungsrate (Efflux) sein. In letzter Zeit wird viel diskutiert, dass an diesen Membranvorgängen Kupfertransporter beteiligt sein könnten. Im Zellversuch konnten Holzer et al. zeigen, dass A2780-Ovarialkarzinomzellen mit 20fach gesteigerter Expression des Kupfertransporter CTR1 (vermuteter Influx-Transporter für Cisplatin) zwar etwa 50 % höhere intrazelluläre Cisplatin-Spiegel aufwiesen als die parentalen A2780-Zellen, dies jedoch nicht zu einer höheren Platinierung der DNA führte.³⁸ Daneben

werden auch die beiden Kupfer-Efflux-Transporter ATP7A und ATP7B mit Cisplatin-Transportvorgängen in Verbindung gebracht.³⁹

Erhöhte Konzentrationen Thiolgruppen-haltiger Moleküle (wie z. B. GSH) in einer Zelle können zu einer gesteigerten Resistenz gegen Cisplatin beitragen.⁴⁰ Cisplatin ist jedoch kein Substrat für die Efflux-Pumpe P-Glycoprotein (Pgp), die in vielen Fällen für eine Arzneistoff-Resistenz mitverantwortlich ist.⁴¹

Die zweite Art Resistenzmechanismen fasst die Faktoren zusammen, die die **Induktion der Apoptose verhindern**, nachdem Cisplatin an die DNA gebunden hat. Defekte in allen Reparatursystemen sind bekannt, die zu einer Resistenz der Zelle gegenüber Cisplatin führen.

Von bestimmten DNA-Glykosylasen, die in den ersten Schritt des BER involviert sind, ist bekannt, dass diese mit hoher Affinität an Cisplatin-Addukte binden. Kartalou et al. vermuten, dass durch diese „Entführung“ der DNA-Glykosylasen die Reparatur anderer DNA-Schäden unterbleibt. So kann es sowohl zu einer gesteigerten Mutationsrate als auch zu einer gesteigerten Apoptoserate der Zellen aufgrund der Akkumulation von DNA-Schäden kommen, was indirekt mit der Sensitivität der Zellen zusammenhängt.⁴² Eine andere Theorie besagt, dass die Glykosylasen sich an Cisplatin-DNA-Addukte binden, und diese dann dem NER zuführen, da sie sie nicht selbst entfernen können. Dadurch könnte die Effizienz der DNA-Reparatur gesteigert werden, was zur Cisplatin-Resistenz führt.⁴³

Überexpressionen der NER-Proteine ERCC1 und XPA wurden in Proben von Ovarialkarzinom-Patientinnen gefunden, die nicht auf eine Cisplatin-basierte Chemotherapie ansprachen.^{44;45} In Expressionsversuchen mit Zelllinien konnte dieser Zusammenhang zwischen ERCC1/XPA und Cisplatin-Resistenz bestätigt werden.⁴⁶

Ein defektes MMR-System führt im Zellversuch zu einer 2- bis 3fachen Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin, bei methylierenden Agenzien zeigte sich sogar eine bis zu 100fach größere Resistenz in der MMR-defizienten Zelllinie.⁴⁷ Das MMR-System interagiert daneben auch mit der Zellzykluskontrolle. Von MMR-defizienten Zellen ist bekannt, dass diese nicht in den Zyklusarrest gehen.⁴⁸ Die beiden *Mismatch*-Reparatur-Gene PMS2 und MLH1 werden von p53 reguliert, das einen Einfluss über die Entscheidung zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose hat.⁴⁹⁻⁵¹ Der Funktionsverlust von p53 führt zur genomischen Instabilität der Zellen, die

so überleben können, obwohl sie normalerweise aufgrund ihrer DNA-Schäden in die Apoptose gegangen wären.

Man hat beobachtet, dass 1,3-Intrastrangvernetzungen 15-20fach effektiver repariert werden als 1,2-Intrastrangvernetzungen. Das liegt an der unterschiedlichen Störung der räumlichen Struktur der DNA durch die verschiedenen Addukte, denn an 1,2-Intrastrangvernetzungen binden HMG-Proteine (*high mobility group*) mit hoher Affinität und Spezifität.⁴³ Viele der HMG-Proteine agieren normalerweise als Transkriptionsfaktoren. Durch die Cisplatin-Addukte werden sie von ihren natürlichen Bindungsstellen „weggelockt“, so dass sie ihre Aufgaben in der Transkriptionsmaschinerie der Zelle nicht mehr erfüllen können und die Zelle stirbt.⁵² Eine weitere Theorie zur Interaktion der HMG-Proteine mit Cisplatin-Addukten besagt, dass die HMG-Proteine die Cisplatin-Addukte abschirmen und damit die DNA-Reparatur verzögern, wodurch die normale Funktion der Zelle gestört und so der Zelltod herbeigeführt wird. Auf diese Weise fördert die gesteigerte Expression von HMG-Proteinen die Sensitivität der Zelle gegenüber Cisplatin.^{53;54} Zamble et al. fanden in Hodentumoren das testisspezifische tsHMG, in dessen Expression sie eine Erklärung für die Cisplatin-Sensitivität von Hodentumoren sehen.⁵⁵

1.3 Differentielle Genexpressionsanalyse

1.3.1 Überblick

Eine differentielle Genexpressionsanalyse vergleicht das Transkriptom zweier Organismen. Im Laufe der letzten Jahre wurden verschiedene Techniken zur Genexpressionsanalyse etabliert. Sie unterscheiden sich primär darin, ob sie ein so genanntes offenes System darstellen, das es erlaubt, unbekannte Gene oder Gene, von denen man nicht erwartet hätte, dass sie differentiell exprimiert sind, zu identifizieren, oder sie sind ein geschlossenes System, welches das Wissen darüber voraussetzt, welche Sequenzen man untersuchen möchte. Zu diesen so genannten geschlossenen Systemen gehören cDNA-Mikroarrays, die eine komplette Transkriptomanalyse ermöglichen. Voraussetzung dafür ist die komplette Sequenzierung des humanen Genoms.^{56;57} Vor einigen Jahren jedoch waren Techniken überlegen, die nicht auf bekannte Sequenzen zurückgriffen, sondern die Entdeckung vorher nicht bekannter Sequenzen ermöglichten. Dazu gehören die serielle Genexpressionsanalyse SAGE^{58;59} und die in dieser Arbeit angewandte suppressive Subtraktionshybridisierung SSH⁶⁰.

1.3.2 Suppressive subtraktive Hybridisierung

Die suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) wurde 1999 von Diatchenko et al. beschrieben.⁶⁰ Ausgangspunkt der SSH ist die mRNA zweier Proben, deren Genexpressionsmuster miteinander verglichen werden sollen. Die erste mRNA-Probe dient als so genannter Tester, von der man die zweite Probe, den Driver subtrahiert. Als Ergebnis erhält man Bruchstücke von Genen, die in der ersten Probe im Vergleich zur zweiten Probe überexprimiert sind. Subtrahiert man in einem Parallelansatz die erste Probe von der zweiten, erhält man ein Bild überexprimierter Gene in der zweiten Probe. Zu bedenken ist, dass eine Überexpression in der einen Probe auch bedeuten kann, dass dieses Gen nicht hochreguliert ist, sondern in der anderen Probe herunterreguliert ist. Eine Hochregulierung bedeutet eine verstärkte Expression in der entsprechenden Probe im

Vergleich zu der zweiten Probe. Dies ist jedoch immer ein relativer Vergleich.

Während der verschiedenen, meist PCR-basierten Schritte der SSH kommt es zu einer Anreicherung der differentiell exprimierten Gensequenzen und zu einer Unterdrückung (Suppression) nicht differentiell exprimierter Sequenzen. Hauptvorteil der SSH ist die völlig unvoreingenommene Identifizierung differentiell exprimierter Gene zwischen zwei biologischen Organismen. Mit Hilfe der SSH ist es möglich, jede differentiell exprimierte Sequenz, auch bisher unbekannte Sequenzen und Gene, zu identifizieren. Ebenso ist es möglich, Genexpressionsstudien nicht sequenzierter Organismen durchzuführen.

Ausgangsmaterial für die SSH war in dieser Arbeit die mRNA der Cisplatin-sensitiven Zungenkarzinomzelllinie Cal27sens und der Cisplatin-resistenten Subzelllinie Cal27res. Die ersten Schritte der SSH sind die Umschreibung der beiden mRNA-Proben in cDNA, die in zwei Schritten abläuft: Erst die Synthese des ersten cDNA-Stranges und anschließend die Synthese des zweiten cDNA-Stranges. Dann folgt ein RsaI-Verdau beider Proben, um die großen cDNA-Stränge in kleinere Doppelstränge mit stumpfen Enden zu schneiden. Um die SSH in zwei Richtungen (sensitiv minus resistent und resistent minus sensitiv) durchführen zu können, werden beide RsaI-verdauten Proben jeweils in zwei gleiche Ansätze aufgeteilt, der erste Ansatz wird zum „Tester“, der zweite zum „Driver“. Diese zwei Richtungen der SSH sind in Abbildung 1.6 näher erklärt.

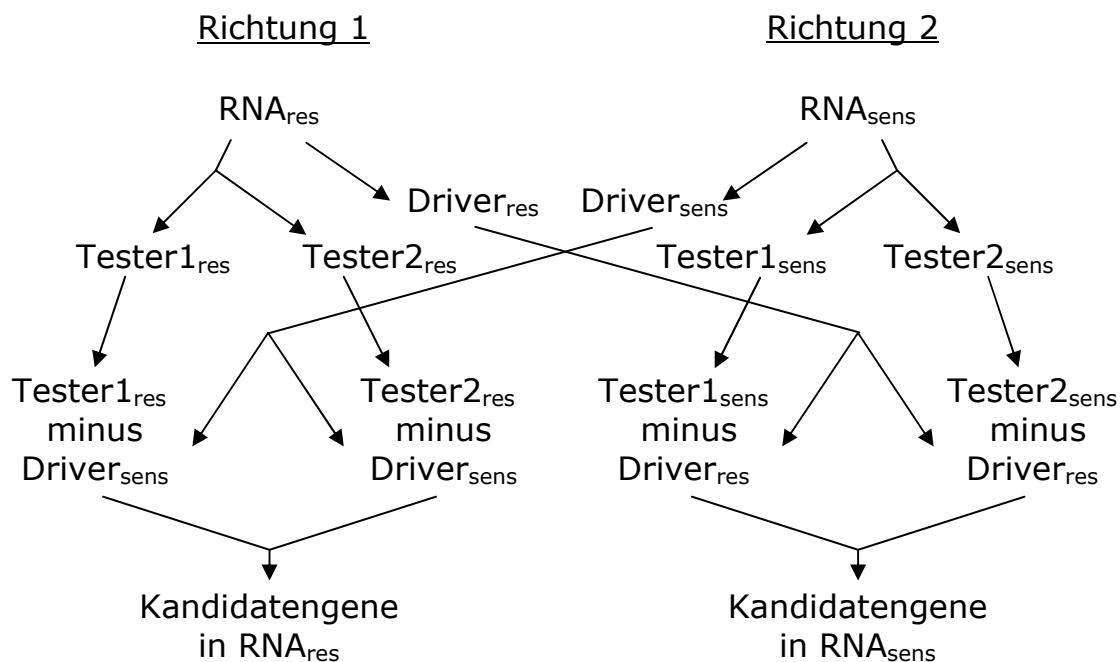


Abbildung 1.6: Richtungen der SSH. Für die Richtung 1 werden aus der RNA der resistenten Zelllinie $Tester1_{res}$ und $Tester2_{res}$ generiert, von denen jeweils der aus der sensitiven RNA generierte Driver ($Driver_{sens}$) subtrahiert wird. Nach der Kombination dieser beiden Ansätze erhält man nach zwei PCR-Schritten die Kandidatengene der resistenten Zelllinie. Analoges gilt für die Richtung 2 der SSH, aus der Kandidatengene der sensitiven Zelllinie hervorgehen.

Anhand der Abbildung 1.7 wird der Fall beschrieben, wie die in der resistenten Zelllinie überexprimierten Gene mittels SSH identifiziert werden können. Benötigt werden der $Tester_{res}$ und der $Driver_{sens}$. Der Tester wiederum wird für die Adapter-Ligation in zwei Ansätze aufgeteilt. Der erste Ansatz wird an den beiden 5'-Enden der Moleküle mit einem Adapternukleotid, Adapter 1, ligiert, der zweite Ansatz analog mit einem weiteren Adapternukleotid, Adapter 2R. Während der ersten Hybridisierung nach einer Denaturierung der Proben werden die beiden Tester getrennt voneinander mit jeweils einem Überschuss des Drivers hybridisiert, was in Abbildung 1.7 als Schritt 1 (1) markiert ist. Es entstehen Hybride aus zwei Tester-Einzelsträngen (b), Hybride aus Tester- und Driver-Einzelstrang (c), Hybride aus zwei Driver-Einzelsträngen (e) sowie nicht wieder hybridisierte Einzelstränge des Testers (a) bzw. Drivers (d). Dann folgt ohne eine erneute Denaturierung der Proben allerdings mit Zusatz von frisch denaturiertem Driver die zweite Hybridisierung (2), bei der sich noch eine neue Art von Hybrid bilden kann, nämlich ein Hybrid

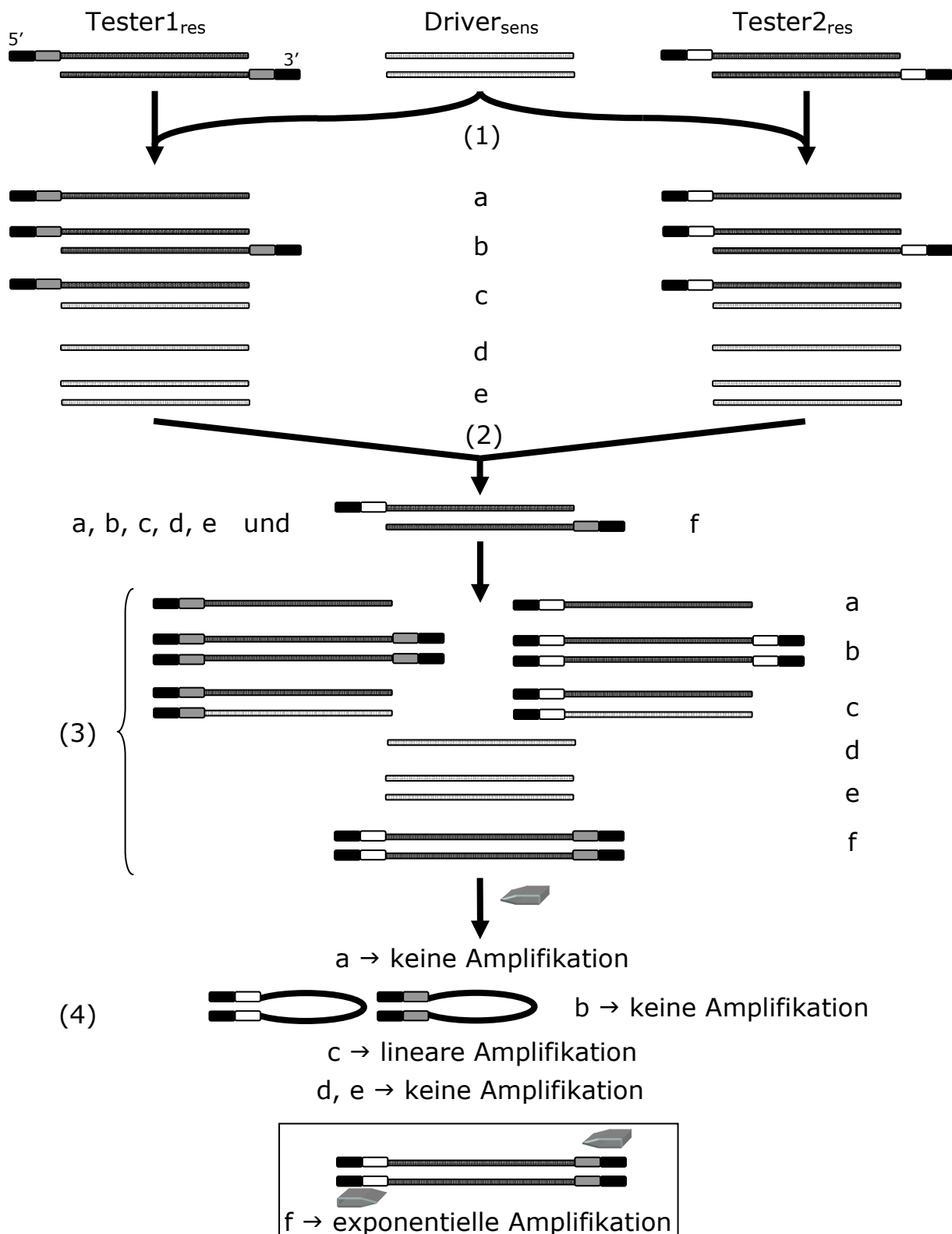


Abbildung 1.7: schematischer Ablauf der SSH, detaillierte Beschreibung im Text.

(1) erste Hybridisierung

(2) zweite Hybridisierung

(3) Auffüllen der freien 3'-Enden

(4) PCR-Amplifikation

aus zwei Tester-Einzelsträngen, die mit verschiedenen Adaptern ligiert sind (f). Genau dies sind die zu identifizierenden Sequenzen, da sie selbst durch einen Überschuss an Driver nicht „neutralisiert“ werden können, also im Tester gegenüber dem Driver überexprimiert vorliegen. Dann folgt das „Auffüllen“ der freien 3'-Enden der Doppelstränge mit der komplementären Adaptersequenz (3). Diese Sequenzen am 3'-Ende sind nun die Primer-Bindungsstellen für die folgende PCR-Amplifikation (4). Dadurch können Einzelstränge, die nur den ursprünglichen Adapter tragen (a), Driver-Einzelstränge (d) und Driver-Doppelstränge (e) nicht amplifiziert werden, da sie **keine** Primerbindungsstelle besitzen. Hybride des Typs (b) bilden nach der Denaturierung der Probe aufgrund der komplementären Sequenzen der Enden haarnadelartige Strukturen aus und bieten dem Primer so keine Bindungsstelle. Die Hybride aus Tester und Driver (c) tragen am Driver-Strang **eine** Primerbindungsstelle und können daher nur linear amplifiziert werden. Hingegen können die differentiell exprimierten Sequenzen, die als Hybride des Typs (f) in der Probe vorliegen und **zwei** Primer-Bindungsstellen tragen, exponentiell amplifiziert und angereichert werden.

Über Polyacrylamidgele können die PCR-Produkte aufgetrennt, Fragmente etwa gleicher Größe durch Klonierung in *E. coli* vereinzelt und für die Sequenzierung mittels PCR amplifiziert werden. Die so generierte Genbibliothek enthält die in der resistenten Zelllinie überexprimierten Gene. Durch Vertauschen von Tester und Driver kann man in einem parallelen SSH-Ansatz eine zweite Bibliothek generieren, die die in der sensitiven Zelllinie überexprimierten Gene enthält (vergleiche Abbildung 1.6).

2 Zielsetzung

Die Antwort einer Zelle auf das Zytostatikum Cisplatin ist gekennzeichnet durch das Zusammenspiel verschiedener Reparaturmechanismen, Entgiftungsreaktionen, Toleranzmechanismen und der Einleitung der Apoptose. Veränderungen in der Expression und Mutationen verschiedener Proteine dieser Bereiche leisten ihren Beitrag zur Chemosensitivität einer Zelle gegenüber Cisplatin. Das multifaktorielle Phänomen der Cisplatinresistenz kann mit den bisher identifizierten Proteinen nur unzureichend erklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung neuartiger Resistenzmechanismen durch die *in vitro*-Untersuchung von Tumorzellen. Ausgehend von einer Kopf-Hals-Tumorzelllinie sollte eine Cisplatin-resistente Subzelllinie etabliert und charakterisiert werden. Auf der Ebene der Genexpression sollte diese Zelllinie dann mit ihrer sensitiven Ursprungs-Zelllinie mittels Suppressiver Subtraktiver Hybridisierung verglichen werden, um so neue Kandidatengene der Cisplatinresistenz zu identifizieren. Dazu sollten beide Zellen zuvor mit therapeutisch relevanten Plasmaspiegeln von 10 μM Cisplatin behandelt werden, um die unterschiedlichen Reaktionsmöglichkeiten der Zelllinien auf Cisplatinstress zu erkennen.

Des Weiteren sollte dann untersucht werden, inwieweit bei anderen Tumor-Zelllinien eine differentielle Expression dieser identifizierten Kandidatengene besteht und ob eventuell eine Korrelation der Genexpression mit dem Resistenzgrad der Zelllinien möglich ist.

Als weitere Zielsetzung ergab sich aufgrund der Ergebnisse der SSH die Untersuchung des Kandidatengenes DKK1, welches eine Rolle im Wnt/ β -Catenin-Signalweg spielt. Durch Überexpression von DKK1 in der resistenten und sensitiven Zelllinie sollte der Einfluss von DKK1 auf die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin geklärt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Reagenzien und Chemikalien

Ampicillin-Na	[C ₁₆ H ₁₈ N ₃ NaSO ₄]	K029	Roth
BES	[C ₆ H ₁₅ NO ₅ S]]	B9879	Sigma
Bicinchoninsäure-Monohydrat	[C ₂₀ H ₁₀ N ₂ Na ₂ O ₄ xH ₂ O]	14339	Fluka
Biozym Agarose DNA			Biozym
Bovines Serumalbumin (ELISA)		A7030	Sigma
Bovines Serumalbumin		A7906	Sigma
Calciumchlorid	[CaCl ₂]	1.02382	Merck
Chloramphenicol	[C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅]	23275	Fluka
Chloroform	[CHCl ₃]	1.02445	Merck
Chloroquin-Diphosphat	[C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ x2H ₃ PO ₄]	25745	Fluka
Cisplatin	[Pt(NH ₃) ₂ Cl ₂]	P4394	Sigma
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	[O(COOC ₂ H ₅)]	D5758	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	[C ₂ H ₆ SO]	4720	Roth
Dinatriumhydrogenphosphat	[Na ₂ HPO ₄]	1.06559	Merck
DTT	[C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂]	A1101	AppliChem
EDTA	[C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈]	E9884	Sigma
Eisessig	[CH ₃ COOH]	A6283	Sigma
Essigsäure	[CH ₃ COOH]	1.00058	Merck
Ethanol absolut p. a.	[C ₂ H ₆ O]	1.00983	Merck
Formaldehyd 37 %	[HCHO]	F1635	Sigma
Formamid	[HCONH ₂]	F7503	Sigma
Geneticindisulfat	[C ₂₀ H ₄₀ N ₄ O ₁₀ x2H ₂ SO ₄]	0239	Roth
Glycerol 99,5%ig	[C ₃ H ₈ O ₃]	3783	Roth
Glycin	[C ₂ H ₅ NO ₂]	23390	Serva
Hefeextrakt		Y0500	Sigma
Hepes	[C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S]	H3375	Sigma

Isoamylalkohol	[C ₅ H ₁₂ O]	I3642	Sigma
Isopropanol absolut p. a.	[C ₃ H ₈ O]	1.09634	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	[KH ₂ PO ₄]	1.04873	Merck
Kanamycin-Monosulfat	[C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ ·xH ₂ O] K4000		Sigma
Kristallviolett	[C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃]	T123	Roth
Kupfersulfat-Pentahydrat	[CuSO ₄ · 5 H ₂ O]	197730010	Acros
LB Agar Tablets		L7025	Sigma
Mineralöl		M5904	Sigma
MTT	[C ₁₈ H ₁₆ BrN ₅ S]	M2128	Sigma
Natriumacetat	[NaCH ₃ COO]	6773	Roth
Natriumacetat-Puffer (pH 5,2 ± 0,1 bei 25 °C)		S7899	Sigma
Natriumcarbonat	[Na ₂ CO ₃]	1.06393	Merck
Natriumchlorid	[NaCl]	1.06404	Merck
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	[C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O]	1.06432	Merck
Natriumhydrogencarbonat	[NaHCO ₃]	1.06329	Merck
Natriumhydroxid p. a.	[NaOH]	20606	Acros
Natriumchlorid	[NaCl]	1.06404	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	[NaH ₂ PO ₄ ·xH ₂ O]	1.06346	Merck
Natriumthiosulfat	[Na ₂ S ₂ O ₃]	72049	Fluka
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v)		P3803	Sigma
Petroleumbenzin		24551	Riedel-de Häen
Reinstwasser	gewonnen mittels Millipore Elix [®]		
Salpetersäure konz.	[HNO ₃]		
Salzsäure konz.	[HCl]	1.00317	Merck
Schwefelsäure konz.	[H ₂ SO ₄]	1.00731	Merck
SDS	[C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S]	A2572	AppliChem
Seakem [®] LE Agarose		50001	Cambrex
SeaPlaque [®] GTG Agarose		50111	Cambrex
Silbernitrat	[AgNO ₃]	7908	Roth
Spectinomycin	[C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇ ·2HCl·xH ₂ O]	85555	Fluka
Sulforhodamin B	[C ₂₇ H ₂₉ N ₂ NaO ₇ S ₂]	S1402	Sigma
SYBR [®] GreenII		S9305	Sigma

TRI [®] -Reagenz		T9424	Sigma
Trichloressigsäure (TCA)	[CCl ₃ COOH]	1.00810	Merck
Tricin	[C ₆ H ₁₃ NO ₅]	93355	Fluka
Triton-X100		3051	Roth
Trizma [®] -Base pH 10,5-12,0		T6791	Sigma
Trypton/Pepton		8952.1	Roth
Tween [®] 20		P1379	Sigma
Weinsäure	[C ₄ H ₆ O ₆]	95310	Fluka

3.1.2 Puffer und Lösungen

Allgemein

10X PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)

77 mM Na_2HPO_4
23 mM NaH_2PO_4
1,54 M NaCl
in Reinstwasser lösen, pH 7,4, autoklavieren
im Kühlschrank aufzubewahren
bei Bedarf mit Wasser 1:10 zu verdünnen

1X PBS-Puffer

7,7 mM Na_2HPO_4
2,3 mM NaH_2PO_4
154 mM NaCl
in Reinstwasser lösen, pH 7,4, bei Bedarf autoklavieren
im Kühlschrank aufzubewahren

MTT- und ATP-Test

Isotone Kochsalzlösung

0,9 % NaCl (m/v) in Reinstwasser
sterilfiltrieren und aliquotieren à 1,5 ml
bei -20 °C lagern

Cisplatin-Stammlösung

5 mM Cisplatin in isotoner Kochsalzlösung
aliquotieren, bei -20 °C lagern

Cisplatin-Verdünnungsreihe

aus Cisplatin-Stammlösung unter Verdünnung mit isotoner
Kochsalzlösung herzustellen:
31,6 nM, 100 nM, 3,16 μM , 10 μM , 31,6 μM , 100 μM , 316 μM ,
1 mM und 3,16 mM
aliquotieren à 1 ml, bei -20 °C lagern

MTT-Stammlösung

5 mg/ml in 1X PBS
dunkel und bei 4 °C lagern

MTT-Lyse-Reagenz

50 ml Isopropanol absolut mit 165 μl konz. HCl
bei RT zu lagern

DKK1-ELISA**ELISA-Waschpuffer**

1X PBS mit 0,5 % (m/m) Tween[®] 20
bei Bedarf frisch herzustellen
auch während des Versuchs bei 4 °C zu lagern

ELISA-Blockierungspuffer

2 % BSA (m/m) in 1X PBS
bei Bedarf frisch herzustellen

ELISA-Antikörperverdünnungslösung

0,1 % BSA (m/v) in 1X PBS
bei Bedarf frisch herzustellen

ELISA-Stopplösung

5 ml H₂SO₄ konz. ad 50,0 mit Reinstwasser
bei RT zu lagern

Sulforhodamin-Färbung**Sulforhodamin-Lösung**

0,4 % Sulforhodamin B (SRB) (m/v)
in 1 % Essigsäure
bei 4 °C zu lagern

Trichloressigsäure-Lösung

50 % Trichloressigsäure (m/v)
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

Essigsäure-Lösung

10 % Essigsäure (v/v)
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

Waschlösung

Essigsäure-Lösung 1:10 mit Reinstwasser verdünnen
bei Bedarf frisch herzustellen

Solubilisierungslösung

10 mM Trizma[®]-Base pH 10,5-12,0
in Reinstwasser, bei 4 °C zu lagern

RNA-Isolierung

DEPC-Wasser

0,1 % (v/v) DEPC in Reinstwasser

Zur Inaktivierung von RNasen in Lösungen werden diese mit DEPC für ein bis zwei Stunden bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. DEPC ist cancerogen, beim Umgang mit reinem DEPC muss vorsichtig und unter dem Abzug gearbeitet werden. Zur Inaktivierung werden die Lösungen autoklaviert, dabei zerfällt das DEPC rückstandslos.

steril, bei 4 °C zu lagern

75 % Ethanol/DEPC (v/v)

Ethanol p. a. abs. mit DEPC-Wasser 1:3 verdünnen
bei RT zu lagern

1X TE-Puffer pH 7,5 für UV

10 mM Tris-HCl

0,1 mM EDTA

pH 7,5, autoklavieren, bei 4 °C zu lagern

wird nur für die UV-Messung verwendet!

RT-PCR

1X TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten

20X TE-Puffer aus *PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit*

1:20 mit Ampuwa verdünnt

enthält final 10 mM Tris-HCl

0,1 mM EDTA

Primer-Stammlösungen

125 µM in 1X TE pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten
bei -20 °C zu lagern

Primer-Gebrauchslösung

12,5 µM in 1X TE pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten
aliquotieren à 100 µl, bei 4 °C zu lagern

Primer-Mischung

1,25 µM je Primer (wenn rechter und linker Primer in einer
finalen Konzentration von 500 nM eingesetzt werden)
in 1X TE pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten
bei 4 °C zu lagern

Gelelektrophoresen

10X Hepes-Puffer (RNA-Gele)

200 mM Hepes
10 mM EDTA
50 mM NaCH₃COO
in DEPC-Wasser, pH 7,2, autoklavieren
bei 4 °C zu lagern

50X TAE-Puffer (DNA-Gele)

2 M Trizma[®]-Base pH 10,5-12,0
1 M CH₃COOH
50 mM EDTA
in Reinstwasser lösen, pH 8,5, autoklavieren
bei 4 °C zu lagern

1X Hepes-Laufpuffer (RNA-Gele)

10X Hepes-Puffer 1:10 mit DEPC-Wasser verdünnen
bei Bedarf frisch herzustellen

1X TAE-Laufpuffer (DNA-Gele)

50X TAE-Puffer 1:50 mit Reinstwasser verdünnen
bei Bedarf frisch herzustellen

10X SYBR[®]GreenII-Lösung

SYBR[®]GreenII 1:100 in 1X TE pH verdünnen
aliquotieren
Aliquots bei -20 °C lagern
ein Aliquot zum baldigen Verbrauch bei 4 °C lagern

Gel-Ladepuffer

2,5 mg/ml Bromphenolblau
30 % Glycerol (v/v)
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

Mirror orientation selection (MOS)

NTE-Buffer

10 mM NaCl
in 1X TE-Puffer pH 7,5 pH für molekularbiologische Arbeiten

Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Fixierlösung für Silberfärbung

15 % Ethanol
5 % Eisessig
in Reinstwasser
bei RT zu lagern

Silber-Stammlösung

2 % AgNO_3 (m/v)
in Reinstwasser
bei 4 °C und lichtgeschützt zu lagern

Silberlösung für Silberfärbung

0,1 % AgNO_3 (m/v) (aus Silber-Stammlösung)
0,037 % Formaldehyd
in Reinstwasser
bei Bedarf frisch herzustellen

Natriumcarbonat-Stammlösung

10 % Na_2CO_3 (m/v)
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

Natriumthiosulfat-Stammlösung

2 % Natriumthiosulfat
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

Entwicklungslösung für Silberfärbung

2,5 % Na_2CO_3
0,037 % Formaldehyd
0,002 % Natriumthiosulfat
in Reinstwasser
bei Bedarf frisch herzustellen

Entwicklungs-Stopplösung

2 % Glycin (m/v)
0,5 % Na-EDTA (m/v)
in Reinstwasser
bei Bedarf frisch herzustellen

Imprägnierlösung

10 % Glycerol (v/v)
in Reinstwasser, bei RT zu lagern

Differentielles Screening**20X SSC**

3 M NaCl
0,3 M Na₃-Citrat
in Reinstwasser
auf pH 7,0 einstellen
bei RT zu lagern

20 % SDS

20 % SDS (m/v)
in Reinstwasser
bei RT zu lagern

hochstringente Waschlösung

0,5X SSC
0,1 % SDS
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

mittelstringente Waschlösung

1X SSC
0,1 % SDS
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

niedrigstringente Waschlösung

2X SSC
0,1 % SDS
in Reinstwasser
bei 4 °C zu lagern

Strip-Lösung

0,2 M NaOH
0,1 % SDS
in Reinstwasser
bei RT zu lagern

Kultivierung von Bakterien

Chloramphenicol-Stammlösung

34 mg/mL Chloramphenicol
in Ethanol absolut p. a.
bei -20 °C zu lagern

Spectinomycin-Stammlösung

10 mg/ml Spectinomycin
in Reinstwasser
sterilfiltrieren
bei -20 °C zu lagern

Ampicillin-Stammlösung

100 mg/ml Ampicillin-Natrium
in Reinstwasser
sterilfiltrieren
bei -20 °C zu lagern

Kanamycin-Stammlösung

50 mg/ml Kanamycinsulfat
in Reinstwasser
sterilfiltrieren
bei 4 °C zu lagern

Ampicillin-Agarplatten für Blau-Weiß-Screening geeignet

1 Beutel imMedia™ Amp Blue
in 200 ml Reinstwasser aufkochen
auf zehn 6,9cm²-Petrischalen verteilen, aushärten lassen
Platten mit Parafilm verschließen
bis zum Gebrauch bei 4 °C lagern

Agarplatten mit anderen Antibiotika

1 LB-Agar-Tablette
pro 50 ml Reinstwasser lösen
autoklavieren
nach dem Abkühlen der noch flüssigen Lösung
entsprechendes Antibiotikum zusetzen, auf Platten
verteilen (20 ml pro 6,9cm²-Petrischale), Platten mit
Parafilm verschließen und bis zum Gebrauch bei 4 °C
lagern

LB-Medium

1 % Trypton
0,5 % Hefeextrakt
1 % NaCl
in Reinstwasser lösen
autoklavieren, bei 4 °C zu lagern
vor Gebrauch mit entsprechendem Antibiotikum versetzen

Glycerol 60%ig

30,3 ml Glycerol 90 %
19,7 ml Reinstwasser
sterilfiltrieren
bei 4 °C lagern

Transfektion und Transformation**10X Fixierpuffer**

20 % Formaldehyd (v/v)
2 % Glutaraldehyd
in 10X PBS, bei RT lagern

Chloroquin-Lösung

8 mg/ml Chloroquindiphosphat in isotoner Kochsalzlösung
sterilfiltrieren, bei 4 °C lagern

2X BBS-Puffer

50 mM BES
280 mM NaCl
1,5 mM Na₂HPO₄
exakt auf pH 6,95 einstellen
sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20 °C lagern

CaCl₂-Lösung

2,5 M CaCl₂ in Reinstwasser
sterilfiltrieren
bei RT zu lagern

Geneticin-Stammlösung

100 mg/ml aktives Geneticin
in Reinstwasser, sterilfiltrieren
aliquotieren, bei -20 °C lagern

3.1.3 Verwendete Kits

Die benötigten Kit-Inhalte sind an der Stelle aufgeführt, an der sie behandelt und benutzt werden.

Advantage cDNA PCR Kit, Cat. No. 639101, Clontech Laboratories, Palo Alto, USA [bei -20 °C zu lagern]

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetrisch), Cat. No. 11 647 229 001, Roche Applied Science, Mannheim, [bei 4 °C zu lagern]

DNA Extraktion Kit, #K0518, Fermentas Life Sciences, St. Leon-Rot

DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, Cat. No. 11 585 614 910, Roche Applied Science

DIG Wash and Block Buffer Set, Cat. No. 11 585 762 001, Roche Applied Science

Enhanced Avian HS RT-PCR Kit, HSRT-100, Sigma [bei -20 °C zu lagern]

GenElute™ mRNA Miniprep Kit, MRN10, Sigma [bei RT zu lagern]

High-Capacity cDNA Archive Kit, Part Number 4322171, Applied Biosystems, Darmstadt [bei -20 °C zu lagern]

KodakGBX Fixer and Developer Twin Set, Z354147, Sigma

PCR-select™ cDNA Subtraction Kit, K1804-1, Clontech Laboratories [bei -20 °C zu lagern]

PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit, P-7589, Molecular Probes

PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit, K2100-05, Invitrogen, Karlsruhe

Rapid Plasmid Miniprep System, Cat. No. 11453-016, Marligen Biosciences, bezogen über Biocat, Heidelberg

Topo TA Cloning Kit, K4550-01, Invitrogen

[E. coli bei -80 °C zu lagern, sonstiges bei -20 °C zu lagern]

3.2 Zellkultur

3.2.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

Materialien und Geräte

Fötales Kälberserum (FKS), F7524, Sigma

L-Glutamin [200 mM], G7513, Sigma

Penicillin-Streptomycin-Lösung [10 000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin], P0781, Sigma

RPMI1640, R8758, Sigma

DMEM, D5671, Sigma

daraus sind bei Bedarf herzustellen und bei 4 °C zum alsbaldigen Verbrauch zu lagern:

RPMI1640-Medium [10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 4 mM L-Glutamin]

DMEM-Medium [10 % FKS, 100 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin und 8 mM L-Glutamin]

Trypsin-EDTA 0,25%ig [0,25 % Trypsin, 0,02 % EDTA], T4049, Sigma

Trypsin-EDTA 1X [0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA], T3924, Sigma
1X PBS-Puffer

Zellkulturschalen Filter Top, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Art.-Nr. 660175 (T175)
Art.-Nr. 658175 (T75)
Art.-Nr. 690175 (T25)

Zellkultur-Multiwell-Platten, Greiner Bio-One GmbH
Art.-Nr. 655180 (96-Well)
Art.-Nr. 662160 (24-Well)
Art.-Nr. 657160 (6-Well)

PP-Röhrchen, Greiner Bio-One GmbH
Art.-Nr. 188271 (15 ml)
Art.-Nr. 227261 (50 ml)

Zentrifuge mit Rotor für PP-Röhrchen

Mikroskop Axiovert25, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland

Inkubator, wasserummantelt, Forma Scientific

Die Zelllinien DU145, MCF7 und T24 wurden freundlicherweise von Dr. Hartmann, Saarbrücken, zur Verfügung gestellt. Die anderen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der *European Collection of Cell Cultures* (ECACC, Salisbury, Wiltshire, UK) oder der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) bezogen.

Die humane Astrozytom-Zelllinie **1321N1** trägt eine p53-Mutation und exprimiert verstärkt das c-myc-Onkogen. Sie wurde adhärent in DMEM-Medium kultiviert.

Der humane Testis-Tumor **2102** und die daraus abgeleitete Subzelllinie **2102KLE** wurden freundlicherweise von Dr. Voigt, Halle, zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien wurden adhärent in RPMI1640-Medium kultiviert.

Die humane Ovarialkarzinom-Zelllinie **A2780** wurde aus einem unbehandelten Tumor etabliert.⁶¹ A2780 ist die parentale Zelllinie von der Cisplatin-resistenten Subzelllinie **A2780cis**. Beide Zelllinien wurden in RPMI1640-Medium kultiviert.

Die humane Colon-Adenokarzinomzelllinie **Caco2** wurde 1974 aus einem primären Colon-Adenom etabliert.⁶² Die adhärent wachsenden Zellen wurden in DMEM mit 20 % FKS kultiviert.

Die humane Zungenkarzinom-Zelllinie **Cal27** wurde 1982 aus einem wenig differenzierten squamös-zelligen Zungenkarzinom eines 56-jährigen Mannes vor der Behandlung etabliert.⁶³ Die Cisplatin-resistente Subzelllinie **Cal27res** wurde im Rahmen dieser Arbeit aus der parentalen Zelllinie Cal27 durch Cisplatin-Behandlung generiert. Beide adhärent wachsenden Zelllinien wurden in DMEM-Medium kultiviert.

Die humane Prostata-Karzinomzelllinie **DU145** wurde 1975 aus einer Gehirnmastase generiert.⁶⁴ Sie wurde adhärent in RPMI1640-Medium kultiviert.

Die primäre embryonale humane Nieren-Zelllinie **Hek293** wurde etabliert und dann stabil mit Adenovirus-5-DNA (Ad5) transformiert.⁶⁵ Diese adhärent wachsende Zelllinie wurde in DMEM-Medium kultiviert.

Die humane hepatozelluläre Zelllinie **HepG2** wurde 1975 aus dem Leberkarzinom eines 15-jährigen Argentiniers etabliert.⁶⁶ Sie wurde adhärent in RPMI1640-Medium kultiviert.

Die humane Colon-Adenomzelllinie **HT29** hat ihren Ursprung 1964 in einem colorectalen, gut differenzierten Primärtumor.⁶⁷ Die Zellen wurden adhärent in DMEM-Medium kultiviert.

Die humane Knochenmarks-Zelllinie **K562** wurde 1970 aus dem Pleuraerguss einer Patientin mit Chronisch Myeloischer Leukämie (CML) in der terminalen Blastenkrise etabliert.⁶⁸ Diese Suspensionszelllinie wurde in RPMI1640-Medium kultiviert.

Die humane Speiseröhrenkarzinom-Zelllinie **Ky510** wurde aus einem gut differenzierten squamös-zelligen Speiseröhrenkarzinom nach Cisplatin- und Radiotherapie etabliert.⁶⁹ Sie trägt p53-Mutationen und amplifiziert c-myc, hst-1 und Cyclin D1. Die adhärente Zelllinie wurde in RPMI1640-Medium kultiviert.

Die humane Brustkrebs-Adenomzelllinie **MCF7** wurde 1970 aus dem Pleuraerguss eines metastasierenden Mammakarzinoms nach Radio- und Hormontherapie etabliert.⁷⁰ Die Zellen wurden adhärent in DMEM-Medium kultiviert.

Die humane Melanomzelllinie **NW1539** wurde freundlicherweise von Dr. Bendas, Bonn, zur Verfügung gestellt. Sie wurde adhärent in DMEM-Medium kultiviert.

Die humane Blasenkarzinom-Zelllinie **T24** wurde 1970 aus einem Primärtumor der Blase etabliert, produziert eine Reihe verschiedener Cytokine und trägt eine p53-Mutation.⁷¹ Die adhärente Zelllinie wurde in DMEM-Medium kultiviert.

Die histiozytäre Lymphom-Zelllinie **U937** wurde 1974 aus dem Pleuraerguss eines Patienten mit generalisiertem diffusem histiozytärem Lymphom generiert.⁷² Diese Suspensionszelllinie wurde in RPMI1640-Medium kultiviert.

3.2.2 Durchführung der Zellkultur

Suspensionszelllinien

Durchführung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer *Laminar-Air-Flow*-Werkbank unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Dies sollte eine Kontamination der Zellkultur mit Bakterien und Pilzen verhindern. Die Suspensionskulturen K562 und U937 wurden in aufrecht stehenden T25-Zellkulturschalen unter normalen Zellkulturbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) kultiviert. Einmal pro Woche wurde die Zellsuspension bei 260 g pelletiert und 1:10 in 15 ml Nährmedium zurück in die Zellkulturschale gegeben. Bis zum nächsten Pelletieren wurde bei verbrauchtem Nährmedium nur frisches Nährmedium hinzugegeben, ohne verbrauchtes zu entfernen.

Adhärent wachsende Zelllinien

① *Trypsin ist eine Endopeptidase, die regioselektiv Peptidbindungen nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und modifiziertem Cystein spaltet. Lässt man Trypsin auf Zellen einwirken, kommt es zuerst ohne Zellschädigung zu einer Spaltung der extrazellulären Proteine, so dass sich die Zellen voneinander und von der Zellkulturschale lösen.*

Durchführung

Konfluente Zellkulturschalen adhärent wachsender Zelllinien wurden zum Passagieren der Zellen nach dem Absaugen des Nährmediums mit einer ausreichenden Menge 1X PBS-Puffer gewaschen, um Reste des Nährmediums, das FKS und andere Trypsin-inhibierende Substanzen enthält, zu entfernen. Stark anhaftende Zelllinien wie Cal27sens, Cal27res, HepG2 etc. wurden mit 0,25%igem Trypsin versetzt, bei nicht so stark anhaftenden Zelllinien war 0,05%iges Trypsin ausreichend. Die Trypsin-Menge richtete sich nach den verwendeten Zellkulturschalen. Für T25-Zellkulturschalen wurde 1 ml, für T75-Zellkulturschalen 2 ml und für T175-Zellkulturschalen 3 ml Trypsin verwendet. Die Zellen wurden während der Inkubation mit Trypsin in den Inkubator gestellt und in kurzen Zeitabständen durch vorsichtiges Schlagen seitlich auf die Zellkulturschale geprüft, ob sich die Zellen ablösten.

Wenn sich ein Großteil der Zellen gelöst hatte, wurde die Zellkulturflasche mit frischem Nährmedium (7, 8 oder 9 ml, je nach eingesetztem Trypsin-Volumen, d. h. Gesamtvolumen ad 10 ml) durchgespült und die Zellsuspension in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 260 g pelletiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt und in frischem Nährmedium resuspendiert. Abhängig von der Zelllinie wurden die Zellen für Versuche in entsprechender Dichte in Multiwell-Platten bzw. zur weiteren Kultivierung 1 : 5 bis 1 : 50 in Zellkulturschalen ausgesäht. Alle zwei bis drei Tage wurde das Nährmedium abgesaugt und durch frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Nährmedium ersetzt.

Bestimmung der Zellzahl

① *Das Casy[®]-Zellzählgerät ermöglicht eine elektronische Zellzahl- und Zellvolumenbestimmung auf Grundlage der Widerstandsmesstechnik. Bei der Pulsflächenanalyse wird jede Zelle beim Durchgang durch den Sensor erfasst und die Pulsamplitude mehrere hundert Mal gemessen. Das individuelle Signal einer Zelle wird auf Form, Breite, Fläche und Zeitverlauf hin analysiert, und man erhält außer der Konzentration der Zellen in der Suspension Angaben über ihre Größenverteilung und damit verbunden den mittleren Durchmesser und die minimalen und maximalen Zellgrößen der Probe.*

Materialien und Geräte

Casy[®]1-Zellzähler, Schärfe System, Reutlingen

Casy[®]ton-Lösung, Art. Nr. 43001, Schärfe System

Casy[®]cups

Durchführung

Für Versuche, bei denen eine bestimmte Zellzahl notwendig war, wurde die Zellkonzentration der geernteten und resuspendierten Zellsuspension bestimmt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension in 10 ml sterilfiltrierter Casy[®]ton-Lösung verdünnt und im Casy[®]-Zellzählgerät vermessen.

Rückstellproben der Zellkultur

Materialien und Geräte

Gefrier-Röhrchen Mikro-Schraubröhre 2 ml, Art.-Nr. 72.693.100, Sarstedt, Nümbrecht

DMSO

geerntete Zellen

-80 °C Gefrierschrank

Stickstofftank (-196 °C)

Wasserbad, auf 37 °C vorgewärmt

Durchführung

Je nach Zelllinie wurde die geerntete Zellsuspension auf eine Zellkonzentration von $2-5 \times 10^6$ Zellen verdünnt. 900 µl dieser Zellsuspension wurden in ein Gefrier-Röhrchen pipettiert und mit 100 µl DMSO versetzt. Diese Rückstellproben, die so genannten Backups, wurden bei -80 °C eingefroren und zur Langzeitlagerung nach einiger Zeit in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt. Wurden diese Zellen wieder benötigt, wurden die Gefrier-Röhrchen im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Anschließend wurde die Suspension in eine mit entsprechendem Nährmedium befüllte T75-Zellkulturschale pipettiert und die Zellen unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. Nach etwa 24 h wurde das Nährmedium ausgetauscht, um nicht angewachsene Zellen, so genannte *Floater*, zu entfernen.

3.2.3 Etablierung einer Cisplatin-resistenten Subzelllinie

Ausgehend von den beiden Kopf-Hals-Tumor-Zelllinien Cal27 und Kyse510 wurde versucht, Cisplatin-resistente Subzelllinien zu etablieren. Dazu wurden die Zellen über 14 Passagen über 3 Monate mit Cisplatin gestresst bzw. in der nachfolgenden Passage in Cisplatin-freiem Nährmedium kultiviert. Die Anfangskonzentration lag bei etwa der halben EC_{50} und die Zelllinie Cal27 wurde mit steigenden Resistenzgrad der Cal27-Zelllinie mit zunehmenden Konzentrationen bis 25 µM Cisplatin behandelt. Beim Passagieren wurden die Zellen 1:10 gesplittet und dem Nährmedium wurde gegebenenfalls sofort Cisplatin zugesetzt.

3.3 MTT-Test

3.3.1 Überblick und Durchführung des MTT-Tests

① Der zuerst 1983 von Mosman beschriebene MTT-Test ist ein Zytotoxizitätstest und ermöglicht die Bestimmung des Anteils vitaler Zellen nach Behandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle.⁷³ Dabei wird, wie in Abbildung 3.1 dargestellt, das wasserlösliche, gelbe Substrat MTT ((3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromid) durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems zu wasserunlöslichem, violetter Formazan reduziert. Die Enzyme sind nur in vitalen Zellen aktiv, so dass die Menge an gebildetem Formazan als Maß für die Vitalität der Zellen steht. Inkubiert man Zellen mit steigenden Konzentrationen einer toxischen Substanz, nimmt die Zahl der überlebenden Zellen ab und es wird entsprechend weniger MTT umgesetzt. Mit Hilfe dieser Methode kann für die toxische Substanz die EC_{50} bestimmt werden. Dies ist genau die Substanz-Konzentration, bei der die noch lebenden Zellen halb so viel MTT zu Formazan umsetzen wie die unbehandelte Kontrolle.

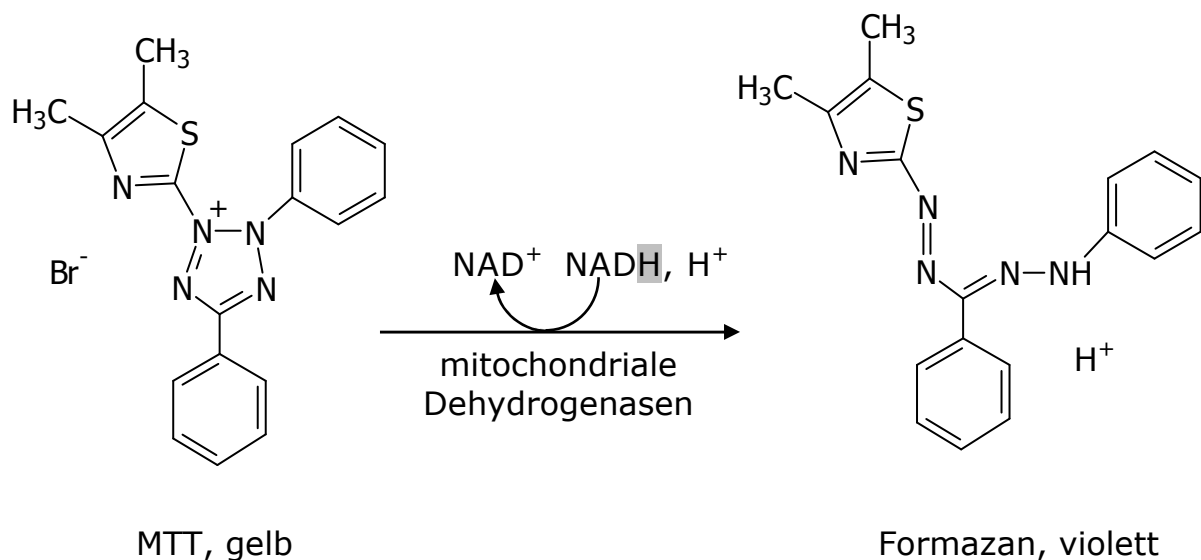


Abbildung 3.1: Reduktion des gelben Tetrazoliums Salzes MTT durch mitochondriale Dehydrogenasen zu dem violetten Formazan.

Materialien und Geräte

96-Well-Mikrotiterplatte, Produkt-Nr. 655180, Greiner Bio-One GmbH

Cisplatin-Verdünnungsreihe

MTT-Stammlösung

MTT-Lyse-Reagenz

POLARstar Galaxy, bmg LabTech GmbH, Offenburg

Durchführung

Die Durchführung des MTT-Tests erfolgte analog der bei Müller et al. beschriebenen Vorgehensweise.⁷⁴ Die optimale Zellzahl für jede Zelllinie ist die, bei der die unbehandelten Zellen nach 72 h Kultivierung etwa 90-95 % konfluent sind. Diese liegt je nach Zelllinie zwischen 1 000 und 10 000 Zellen pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte. Für jeden MTT-Test benötigt man, wie in Abbildung 3.2 dargestellt, eine halbe 96-Well-Mikrotiterplatte. Da aus den äußeren Löchern der Mikrotiterplatte deutlich mehr Nährmedium durch Verdunstung verloren geht, werden nur die inneren Löcher (B-G; 2-11) für den Versuchsansatz verwendet. Damit werden jeweils 3 Replikate (Reihe B/C/D) mit einer isotonen NaCl-Kontrolle (Spalte 2) und einer Cisplatin-Verdünnungsreihe über 9 Konzentrationen (Spalte 3 bis 11) untersucht, um die EC_{50} -Werte zu bestimmen.

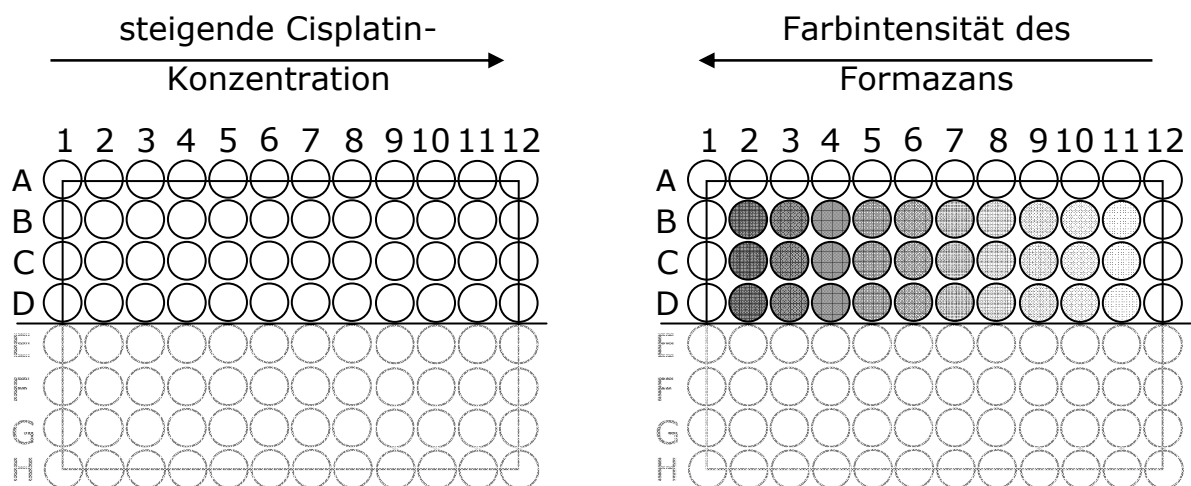


Abbildung 3.2: MTT-Test-Platten. Die Platten wurden mit von links nach rechts steigenden Cisplatinkonzentrationen behandelt. Da die entstehende Farbintensität des Formazans proportional zu der Anzahl lebender Zellen ist, ist die entstehende Färbung auf der Platte von links nach rechts abnehmend.

Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und ihre Zellzahl, wie in 3.2.2 beschrieben, bestimmt. Für eine halbe Platte wurde 55,55mal die optimale Zellzahl pro Well in einem Gesamtvolumen von 5,0 ml aufgenommen. Mit Hilfe einer Mehrkanalpipette wurden 90 μ l Zellsuspension in jedes Well der halben Mikrotiterplatte (der Einfachheit halber auch in die äußeren Wells, die aber für die Versuchsauswertung nicht berücksichtigt wurden) pipettiert und die Zellen für mindestens 4 h, besser über Nacht unter normalen Zellkulturbedingungen anwachsen gelassen. Wenn die Zellen über Nacht angewachsen waren, wurde das Nährmedium der Platte vor Zugabe der Cisplatin-Verdünnungsreihe gewechselt. Dazu wurde die geöffnete Platte zügig umgedreht und so das Nährmedium entfernt. Unter dem *Laminar Air Flow* wurden 90 μ l frisches Nährmedium in jedes Well gegeben (auch in die äußeren Wells als Verdunstungsschutz). Dann erst wurden in Spalte 2 (Reihe B bis D) die Zellen als Kontrolle mit je 10 μ l isotoner Kochsalzlösung versetzt, ab Spalte 3 mit je 10 μ l Cisplatinlösung aufsteigender Konzentration.

Die Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen für 71 h kultiviert. Mit Hilfe einer Multistep-Pipette wurden nach 71 h je Well 20 μ l MTT-Stammlösung hinzugegeben. Während der anschließenden etwa 60 min Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ mit MTT wurden die Zellen gelegentlich unter dem Mikroskop kontrolliert, um eine deutliche Kristallbildung des Formazans rechtzeitig zu erkennen. Die Kristalle würden die lebenden Zellen durchstechen und schädigen.

Nach 60 min, bzw. wenn deutliche Formazankristalle zu erkennen waren entsprechend früher, wurden die Zellen durch Zugabe von 150 μ l MTT-Lyse-Reagenz je Well und wiederholtes Auf- und Abziehen mit einer Multi-kanalpipette gelöst und lysiert. Der Säurezusatz im MTT-Lyse-Reagenz bewirkte, dass der im Nährmedium enthaltene pH-Indikator Phenolrot zu gelb umschlägt, um die Absorptionmessung nicht zu beeinflussen. Um eine vollständige Lösung des Farbstoffes Formazan zu garantieren, wurde der Ansatz für 1 bis 24 h bei 4 °C gelagert. Die Messung der Absorption des gelösten Formazans erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595$ nm gegen eine Referenzwellenlänge von $\lambda = 690$ nm im POLARstar. Die Absorption bei $\lambda = 690$ nm erfasst den Hintergrund von Zelltrümmern und wurde von der Formazan-Absorption bei $\lambda = 595$ nm subtrahiert.

Auswertung

EC₅₀-Werte wurden durch nichtlineare Kurvenanpassung (sigmoidale Dosis-Wirkungs-Kurve, variable Steigung) mit Hilfe des Programms GraphPad Prism 4.0 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, ermittelt. Die sigmoidale Kurvenanpassung folgt der Hill-Gleichung (siehe Gleichung 3.1), $x = \log [\text{Cisplatin}], M$:

$$y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + \left(\frac{10^{\text{LogEC}_{50}}}{10^x} \right)^{\text{Steigung}}} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

Bei einer Auswertung mehrerer Experimente wurden die Absorptionswerte pro Experiment normalisiert. Dies wurde mit Hilfe des Programmes Excel, Microsoft® durchgeführt. Dazu wurden die Absorptionswerte der drei Kontrollen gemittelt. Alle Absorptionen wurden als Prozent dieses Mittelwertes errechnet. So konnten sie dann von verschiedenen Experimenten vereint und durch die oben beschriebene nichtlineare Kurvenanpassung zusammen ausgewertet werden. Ob die ermittelten pEC₅₀-Werte signifikant verschieden voneinander sind, wurde mit dem einseitigen ANOVA-Test und nachgeschaltetem Tukey-Test mit Hilfe des Programmes GraphPad Prism überprüft.

3.3.2 Bestimmung des Resistenzgrades Cisplatin-resistenter Zelllinien

Der Resistenzfaktor gibt den Faktor an, um den die Cisplatin-resistente Subzelllinie mehr Cisplatin toleriert als die Cisplatin-sensitive. Es wird hier als das Verhältnis der EC_{50} -Werte definiert, dargestellt in Gleichung 3.2:

$$RESISTENZFAKTOR = \frac{EC_{50}(resistent)}{EC_{50}(sensitiv)} \quad \text{Gleichung 3.2}$$

Der Fehler des Resistenzfaktors wurde, wie in Gleichung 3.3 dargestellt, nach C. F. Gauß aus der Wurzel der Summenquadrate der einzelnen Fehler ermittelt. GraphPad Prism gibt jedoch keinen Fehler für die EC_{50} an, da dafür die EC_{50} -Werte normalverteilt sein müssen. Davon ausgehend, dass den EC_{50} -Werten eine Normalverteilung zugrunde liegt, kann man aus dem angegebenen 95 %-Konfidenzintervall (KI) die Standardabweichung ermitteln. Betrachtet man die Gauß'sche Glockenkurve, entspricht das 95 %-KI dem Mittelwert $\pm 2\sigma$, also ist $\sigma \approx \frac{1}{4}$ 95 %-KI.

Wenn die $EC_{50} = x$ und das 95 %-Konfidenzintervall = y bis z ist, dann errechnet sich der relative Fehler wie in Gleichung 3.3 dargestellt:

$$SD = \sqrt{\left(\frac{z_1 - y_1}{4x_1}\right)^2 + \left(\frac{z_2 - y_2}{4x_2}\right)^2} \times RESISTENZFAKTOR \quad \text{Gleichung 3.3}$$

3.4 Sulforhodamin-Färbung

① *Sulforhodamin B (SRB) ist ein Farbstoff (siehe Abbildung 3.3), der sich an fixierte Proteine anlagert. Dazu werden Zellen in ihrer Zellkulturschale mit Trichloressigsäure (TCA) fixiert. Der anschließend hinzugegebene Farbstoff SRB färbt die Proteine und kann anschließend in der basischen Trislösung gelöst und colorimetrisch quantifiziert werden.⁷⁵ Mit Hilfe dieser Färbung kann auch die Zytotoxizität analog zum MTT-Test bestimmt werden.⁷⁶*

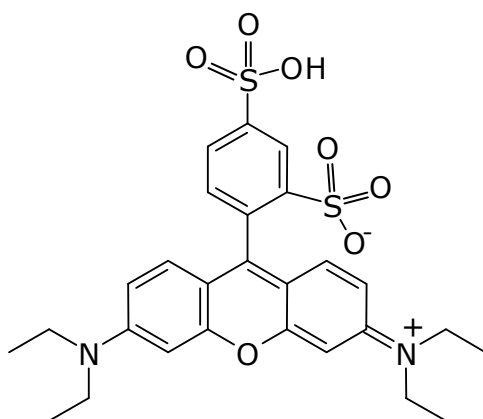


Abbildung 3.3: Strukturformel von Sulforhodamin B.

Materialien und Geräte

Reinstwasser

Sulforhodamin-Lösung

Trichloressigsäure-Lösung

Solubilisierungslösung

Waschlösung

POLARstar Galaxy Mikroplattenleser

Durchführung

Zum Nährmedium der in 96-Well- oder 24-Well-Platten kultivierten Zellen wurde 20 % Trichloressigsäure-Lösung zugesetzt und die Platte für die Fixierung der Zellen für 1 h bei 4 °C gelagert. Anschließend wurden der Überstand entfernt und die fixierten Zellen einige Male mit Reinstwasser gewaschen, um Serumproteine und TCA zu entfernen. 50 µl (96-Well) bzw. 200 µl (24-Well) Sulforhodamin-Lösung wurden pro Well zugesetzt und die Platte bei leichtem Schütteln für etwa 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde

die Platte mehrmals zügig mit Waschlösung gewaschen, bevor der gebundene Farbstoff mit 100 μl (96-Well) bzw. 400 μl (24-Well) Solubilisierungslösung gelöst werden konnte. Die Absorption des Farbstoffes wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 595 \text{ nm}$ gemessen, von der die Hintergrundabsorption bei $\lambda = 690 \text{ nm}$ subtrahiert wurde.

3.5 BrdU-Test

① Der BrdU-Test ist ein Proliferationstest. Es ist ein immunzytochemischer Nachweis des synthetischen Thymidin-Analogen 5-Brom-2'-desoxyuridin (BrdU), welches anstelle von Desoxythymidin während der Replikation in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird. Dieser Test wurde bereits 1982 von Gratzner et al. etabliert.⁷⁷ Die Strukturen von Thymidin und BrdU sind in Abbildung 3.4 vergleichend dargestellt:

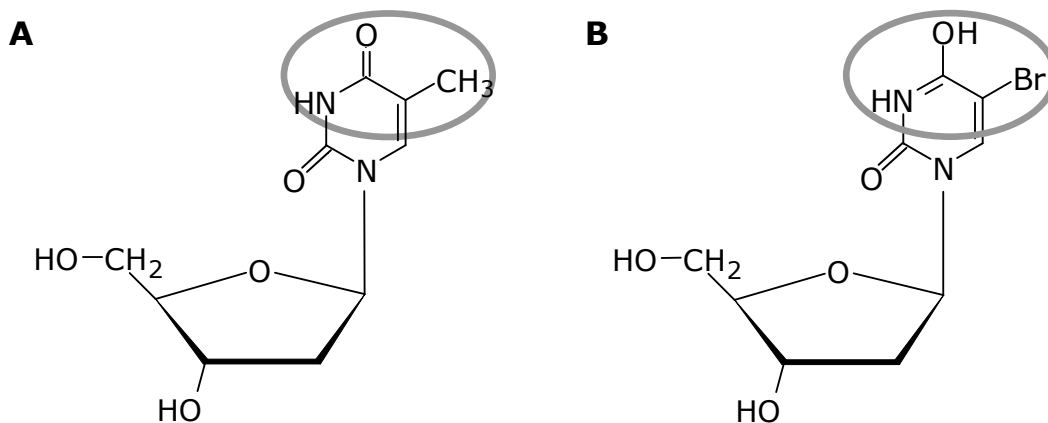


Abbildung 3.4: Struktur des Desoxythymidins (A) im Vergleich mit der Struktur des synthetischen Thymidin-Analogen 5-Brom-2'-desoxyuridin (B): Beide Moleküle bestehen aus einer 2'-Desoxyribose und unterscheiden sich nur in ihrem Basenrest. Desoxythymidin enthält die Base Thymin, BrdU an dessen Stelle ein Uracil, das an Stelle 5 im Ring bromiert ist.

Während des Markierungsschrittes wird dem Nährmedium der zu untersuchenden Zellen BrdU zugegeben. Dieses wird dann in die neu synthetisierte DNA anstelle von Thymidin eingebaut und kann nach dem Fixieren der Zellen an den Zellkulturplatten mit dem dann hinzugegebenen Anti-BrdU-POD-Fab-Fragment binden. Dieser Antikörper ist an das Enzym Peroxidase konjugiert, welches das Substrat Tetramethylbenzidin (TMB), wie in Abbildung 3.5 dargestellt, zu einem blauen Farbstoff umsetzen kann. Durch das Stoppen der Reaktion durch Ansäuern des Milieus kommt es zu einem Farbumschlag von blau nach gelb. Dieser gelbe Farbstoff kann dann colorimetrisch im Mikroplattenleser bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ ausgelesen werden.

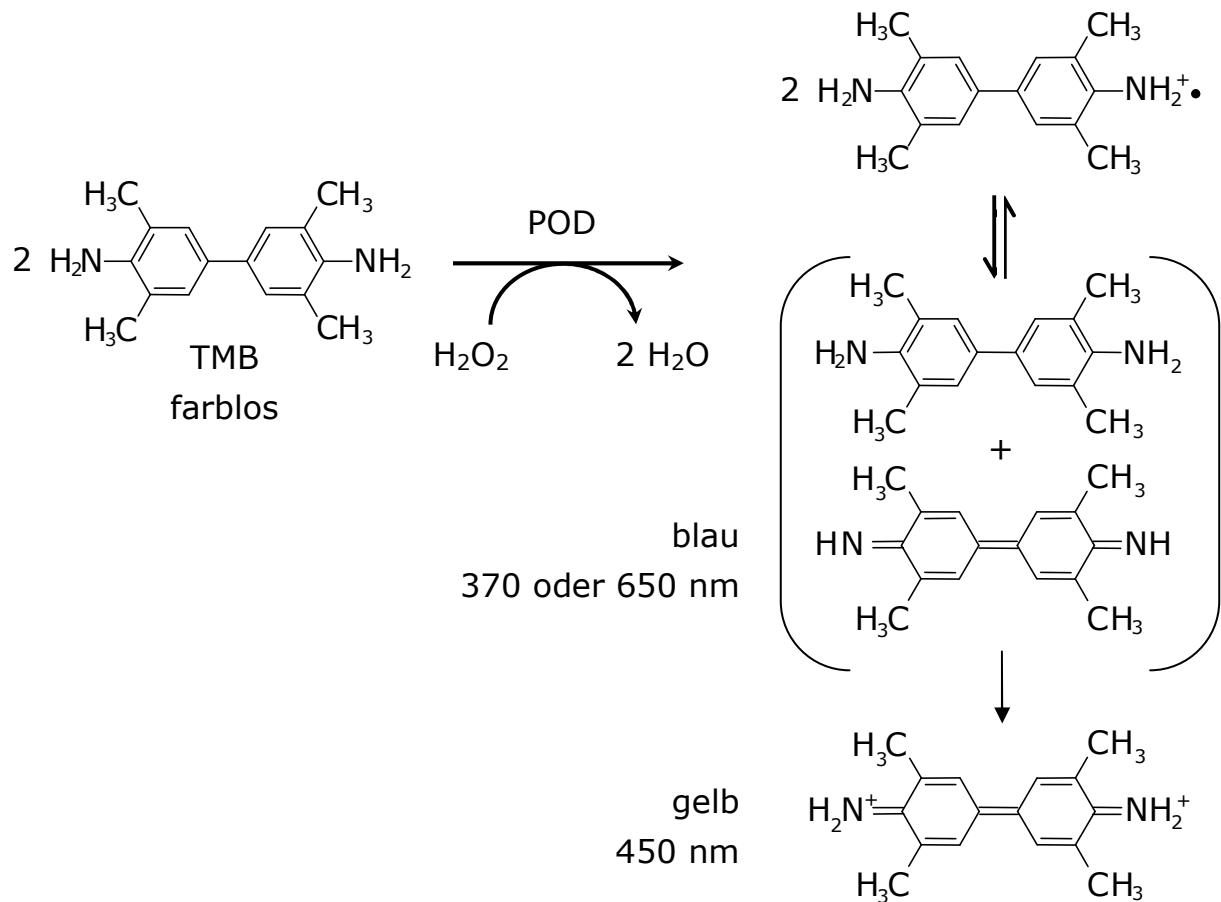


Abbildung 3.5: Tetramethylbenzidin-Farbreaktion: Die Peroxidase (POD) katalysiert die Redoxreaktion zwischen Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

Materialien und Geräte

Cell Proliferation ELISA, BrdU

BrdU-Markierungsreagenz [10 mM 5-Brom-2'-desoxyuridin in PBS, pH 7,4]

FixDenat [keine Angabe]

Anti-BrdU-POD, monoklonaler Antikörper von Maus-Maus-

Hybridzellen (Klon BMG 6H8, Fab-Fragment) konjugiert mit

Peroxidase (POD), lyophilisiert und stabilisiert

Antikörper-Verdünnungslösung [keine Angabe]

Waschpuffer [PBS, 10X]

Substratlösung [Tetramethylbenzidin, keine weitere Angabe]

Ampuwa

96-Well-Mikrotiterplatte

Nährmedium

ELISA-Stopplösung, siehe DKK1-ELISA

Schüttler MS1 Minishaker, IKA® Works, Staufen

FLUOstar OPTIMA, bmg Labtechnologies GmbH

Vorbereitung und Anmerkungen

Die benötigten Lösungen wurden z. T. in einer geringeren Konzentration eingesetzt als im Roche-Protokoll beschrieben.

- Das BrdU-Markierungsreagenz wurde immer frisch 1:1333 mit Nährmedium zur Markierungslösung verdünnt.
- Anti-BrdU-POD wurde in 1,1 ml Ampuwa gelöst und aliquotiert. Ein benötigtes Aliquot wurde mit dem Kit bei 4 °C gelagert, der Übervorrat bei -20 °C.
- Die Antikörperlösung wurde durch 1:200 Verdünnen von Anti-BrdU-POD in Antikörper-Verdünnungslösung hergestellt.
- Der 10X Waschpuffer wurde mit Reinstwasser 1:10 zu der Waschlösung verdünnt.

Durchführung

Die Zellen wurden, wie bei dem MTT-Test unter 3.3 beschrieben, ausgesäht und ebenso mit Zytostatika behandelt. Nach 70 h Inkubation wurden dem Nährmedium je Well 10 µl der BrdU-Markierungslösung mit Hilfe einer Multistep-Pipette zugesetzt und die Platte für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Nährmedium durch Ausschütten der Platte in die Zytostatika-Entsorgungstonne und Aufklopfen auf Papiertücher entfernt. Je Well wurden mit Hilfe einer Multistep-Pipette 150 µl FixDenat zugesetzt und die Platte für 30 min bei RT auf dem Schüttler bei ca. 150 rpm inkubiert. Anschließend wurde diese Lösung wieder abgegossen, und noch anhaftende Flüssigkeitstropfen wurden durch vorsichtiges Aufklopfen auf Papiertücher entfernt. Nach Zugabe von 100 µl Anti-BrdU-POD-Lösung je Well wurde die Platte wieder bei 150 rpm für 90 min bei RT inkubiert. Die Antikörperlösung wurde entfernt (Abgießen, auf Papiertücher vorsichtig aufschlagen) und ebenso dreimal mit 200 µl pro Well Waschlösung gewaschen. Nach dem letzten Entfernen der Waschlösung wurden mit Hilfe einer Multistep-Pipette 75 µl je Well der Substratlösung zugegeben. Die Platte wurde bei RT einige Minuten beobachtet, und bei einer ausreichenden Blaufärbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 25 µl ELISA-Stopplösung je Well gestoppt. Die Absorption wurde bei einer

Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm gegen die Referenzwellenlänge von $\lambda = 690$ nm gemessen.

3.6 Cisplatin-Aufnahme der Zellen

Mittels flammenloser Atom-Absorptionsspektroskopie (AAS) kann die Cisplatin-Menge eines Zelllysates quantifiziert werden.⁷⁸ Dazu wurden 500 000 Zellen pro Well einer 6-Well-Platte ausgesäht und über Nacht anwachsen gelassen. Nach Inkubation der Zellen mit 20 μ M Cisplatin über 3 bzw. 6 h wurden die Zellen mit 1X PBS gewaschen und anschließend geerntet. Das erhaltene Zellpellet wurde in 50 μ l konz. HNO_3 lysiert. Die weitere Aufarbeitung und Vermessung der Proben wurde freundlicherweise von Anand Kumar Rotte des Arbeitskreises Prof. Jaehde durchgeführt, da diese Methode in diesem Arbeitskreis etabliert ist.

3.7 Nukleinsäuren

3.7.1 Aufbau der Nukleinsäuren

① *Ribonukleinsäure (RNA) und Desoxyribonukleinsäure (DNA) sind Polymere aus vier verschiedenen Nukleotiden. Nukleotide bestehen aus einem Basenanteil (Adenin, Cytosin, Guanin oder Uracil bzw. Thymin), einem Zuckeranteil (Ribose bzw. Desoxyribose) und einem Phosphatrest, wobei zwei Nukleotide über eine Phosphat-Zucker-Bindung miteinander verknüpft werden. Dies ist für die RNA in Abbildung 3.6 beispielhaft dargestellt. Die Namen der Nukleotide leiten sich von den Basennamen ab: Adenosin, Cytidin, Guanosin und Uridin bzw. Thymidin und werden mit ihren Anfangsbuchstaben abgekürzt.*

Die Nukleinsäuresynthese beginnt mit einem Nukleotid, an dessen 3'-OH-Gruppe eine Phosphoesterbindung mit der Phosphatgruppe in 5' des nächsten Nukleotids geknüpft wird. An dessen 3'-OH-Gruppe kann dann wiederum ein weiteres Nukleotid angehängt werden usw., so dass die Synthese in 5'-3'-Richtung abläuft. Sequenzen werden daher immer in 5'-3'-Orientierung angegeben.

Die Struktur der DNA wurde 1953 von James Watson und Francis Crick aufgeklärt, die dafür 1962 zusammen mit Maurice Wilkins den Nobelpreis für Medizin erhielten. Die DNA enthält die genetische Information einer Zelle und besteht aus zwei gegenläufigen Einzelsträngen, die eine Doppelhelix ausbilden. Diese ist normalerweise rechtshändig gedreht. Die Basenpaare der komplementären Stränge bestehen immer aus einer Purin- und einer Pyrimidinbase: A mit T und G mit C, die über zwei (A/T) bzw. drei (G/C) Wasserstoffbrücken miteinander verknüpft sind.

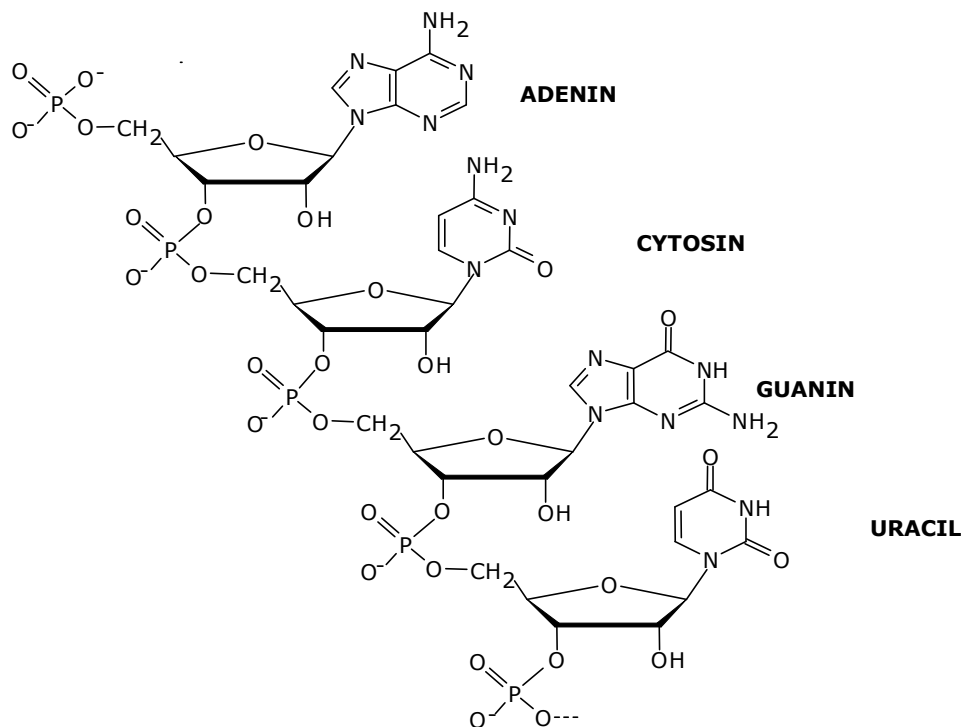


Abbildung 3.6: Strukturformel eines RNA-Stranges.

Ribonukleinsäuren (RNA) werden nach ihrer Funktion in verschiedene Klassen eingeteilt. Die **Transfer-Ribonukleinsäuren** (tRNA) sind relativ kleine Moleküle aus 70 bis 80 Nukleotiden. Sie sind die Träger der Aminoacylreste, die in der Translation auf die wachsende Polypeptidkette übertragen werden. Die **Messenger-Ribonukleinsäuren** (mRNA) sind eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen mit Kettenlängen zwischen einigen 100 bis zu mehreren 1 000 kb. Sie kodieren für die von der Zelle exprimierten Proteine, machen etwa einen Anteil von 2 bis 5 % an der Gesamt-RNA aus. Die mRNA ist für die Genexpressionsuntersuchungen von zentralem Interesse. In Ribosomen höherer Organismen findet man vier verschiedene **ribosomale Ribonukleinsäuren** (rRNA), die nach ihren Sedimentationskonstanten als 5S-, 5,8S- 18S- und 28S-rRNA bezeichnet werden. Sie machen etwa 80 bis 90 % der Gesamt-RNA aus. Im Zellkern befinden sich kleine RNA-Moleküle, small nuclear RNA (**snRNA**), die Bestandteile von Ribonukleoproteinen sind, die z. B. das RNA-Spleißen katalysieren. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer RNA-Moleküle wie die **hnRNA** (heterogene Kern-RNA, Vorstufe der reifen mRNA), **siRNA** (small interfering RNA, spielt eine Rolle in der RNA-Interferenz, einem Schutzmechanismus der Zelle gegen zellfremde RNA, da viele RNA-Viren

RNA-Doppelstränge ausbilden) und **microRNA**, die eng mit der siRNA verwandt ist und ebenfalls an der Genregulierung beteiligt ist.

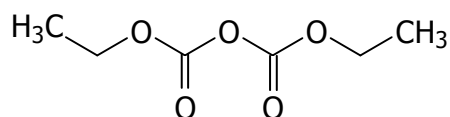
Umgang mit Ribonukleinsäuren

① Durch die im Gegensatz zur DNA zusätzliche 2'-Hydroxygruppe im Ribosering ist die RNA sehr anfällig für den hydrolytischen Abbau. So ist der Umgang mit RNA komplizierter als der mit DNA, da man sehr sauber arbeiten und sicherstellen muss, dass alle benutzten Gefäße frei von RNasen sind. RNasen werden von allen Organismen produziert und ausgeschieden, sie sind ubiquitär und sehr stabil. Sie benötigen im Gegensatz zu DNAsen keine zweiwertigen Cosubstrate wie Mg^{2+} , um aktiv zu sein. Daher muss größte Sorgfalt auf saubere, autoklavierte Gefäße und Pipettenspitzen gelegt werden, die auch nur für die RNA-Isolierung benutzt werden. Alle Arbeiten sind mit Handschuhen durchzuführen und alle Lösungen werden mit DEPC-Wasser angesetzt.

Da die rRNA den Hauptteil der RNA ausmacht, kann man in der Regel nur sie auf denaturierenden Agarosegelen sichtbar machen. Jedoch kann man von der Qualität der rRNA auf die Qualität der übrigen RNA schließen. Man erkennt die 28S- und die 18S-Bande der RNA auf einem Agarosegel etwa bei 5,0 kb bzw. 1,9 kb. Diese Banden sollten scharf sein und die höhermolekulare 28S-Bande sollte in ihrer Intensität etwa doppelt so stark sein wie die 18S-Bande. Ist dies nicht der Fall, muss davon ausgegangen werden, dass die RNA-Probe während der Präparation zumindest teilweise degradiert ist.

Diethylpyrocarbonat

Diethylpyrocarbonat (DEPC) ist ein starker RNase-Inhibitor, dessen Strukturformel in Abbildung 3.7 dargestellt ist:⁷⁹



DEPC

Abbildung 3.7: Strukturformel von Diethylpyrocarbonat (DEPC).

DEPC bindet kovalent an NH-, SH- oder OH-Gruppen, z. B. an die für die katalytische Funktion wichtigen His-Seitenketten (siehe Abbildung 3.8) in den aktiven Zentren vieler RNasen, die so irreversibel gehemmt werden.

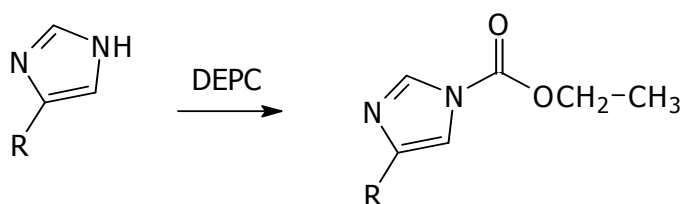


Abbildung 3.8: Kovalente Bindung von DEPC an Histidin.

Um überschüssiges DEPC zu zersetzen, wird die Lösung autoklaviert und DEPC zerfällt, wie in Abbildung 3.9 dargestellt, in Kohlensäure und Ethanol. Da DEPC vermutlich ein starkes Karzinogen ist, findet die Handhabung ausschließlich unter dem Abzug statt.

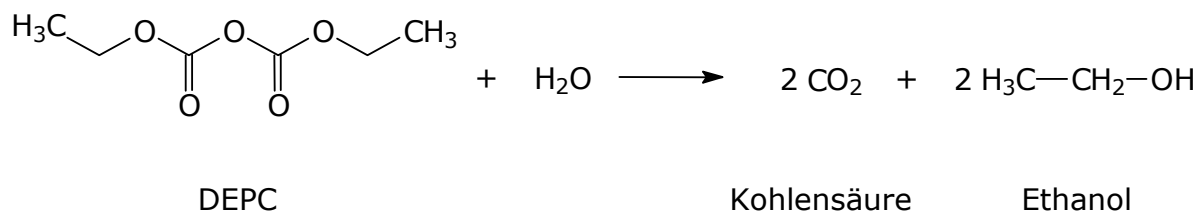


Abbildung 3.9: Zersetzung von DEPC zu Kohlendioxid und Ethanol.

3.7.2 RNA-Isolierung

① Für die RNA-Isolierung werden die Zellen zunächst lysiert. Das wird durch Guanidinthiocyanat erreicht, ein chaotropes Salz, das dazu noch Proteine denaturiert und so RNasen inaktiviert. Chaotrope Salze brechen die relativ geordnete Struktur des Wassers auf, was dazu führt, dass das Wasser gewissermaßen hydrophober wird. Da die Löslichkeit hydrophober Protein-Seitenketten in dem Lysat steigt, werden hydrophobe Wechselwirkungen destabilisiert, und Proteine denaturieren. Die Proteine, ebenso wie kleine DNA-Fragmente, lösen sich in saurem Phenol und können so von der RNA, die in der wässrigen, oberen Phase zurückbleibt, abgetrennt werden. Größere DNA-Fragmente sammeln sich während der Zentrifugation als Interphase. Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und mit Isopropanol versetzt. Isopropanol entzieht der RNA die Hydrathülle, so dass diese aus der wässrigen Phase ausfällt und pelletiert werden kann. Ethanol ist flüchtiger als Isopropanol und wird daher zum Waschen des Pellets eingesetzt. Der Waschschrift entfernt zurückgebliebene Salze, da diese in RT und PCR stören.

Benötigte Lösungen

Cisplatin-Stammlösung

Isotone Kochsalzlösung

Nährmedien

1X PBS-Puffer

Chloroform p. a.

Isopropanol p. a.

75 % Ethanol/DEPC

TRI[®]-Reagenz

DEPC-Wasser

Durchführung

Für die RNA-Isolierung wurde in der Regel eine mit Cisplatin behandelte Probe mit einer unbehandelten parallel angesetzt. Dies erlaubt mittels RT-PCR einen möglichst genauen Vergleich, welche Gene aufgrund der Cisplatin-Behandlung reguliert werden. Dazu wurden geeignete Zellzahlen in zwei T25-Zellkulturschalen ausgesät und für etwa 4 h anwachsen gelassen. Dann wurde der einen Zellkulturschale ein geeignetes Volumen

der Cisplatin-Stammlösung zugesetzt, die andere Zellkulturschale wurde mit der entsprechenden Menge an isotoner Kochsalz-Lösung versetzt.

Nach 24 h wurde in beiden Zellkulturschalen parallel das Nährmedium erneuert. Dazu wurden die anheftenden Zellen zuerst mit 1X PBS gewaschen, bevor sie mit frischem Nährmedium versorgt und die Zellen weiter kultiviert wurden. Nach der gewünschten Auswaschphase wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen wurden mit eiskaltem 1X PBS-Puffer gewaschen, und der PBS-Puffer wurde wieder abgesaugt. Bis zur Lyse der Zellen wenige Minuten später wurden die Zellkulturschalen auf Eis gelagert, um den Stoffwechsel der Zellen so weit wie möglich zu reduzieren und mögliche Veränderungen der Genexpression zu unterbinden.

Unter dem Abzug wurde je Zellkulturschale 1 ml TRI[®]-Reagenz, eine Mischung aus Guanidin-Thiocyanat und Phenol, hinzugegeben. Die dadurch lysierten Zellen wurden mit einem Zellschaber zusammengeschabt und nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Suspensions-Zelllinien wurden bei 260 g pelletiert, der Nährmedien-Überstand abgesaugt und ebenfalls auf Eis gelagert. Nach Zugabe des TRI[®]-Reagenz' wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren lysiert, und das Lysat wurde ebenfalls in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt.

Die mit TRI[®]-Reagenz lysierte Probe wurde 5 min bei RT stehen gelassen, bevor 200 µl Chloroform hinzugegeben wurden. An dieser Stelle war es sehr wichtig, die Probe für etwa 30 sec energisch auf dem Schüttler zu mischen, bevor sie weitere 10 min bei RT stehen blieb. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 12 000 g für 15 min bei 4 °C trennten sich drei Phasen: Die untere, organische Phase mit Proteinen, die DNA sammelt sich als weiße Interphase und die obere, wässrige Phase enthält die gelöste RNA. Von dieser oberen Phase wurden vorsichtig etwa 600 µl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt, ohne die Interphase zu beschädigen. Da die Proben für die RT-PCR isoliert wurden, wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt durchgeführt: Nach Zugabe von 50 µl Isopropanol wurden die Proben für 5 min bei RT stehen lassen und anschließend bei 12 000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Dadurch werden Verunreinigungen, die beim Ausfällen der RNA mit Isopropanol mitgefällt würden, abgetrennt.

Der Überstand wurde wieder in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl 100%igem Isopropanol versetzt. Nach 5 min bei RT wurde die ausfallende RNA durch Zentrifugation bei 12 000 g für 15 min bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert, das Pellet mit 75%igem Ethanol in DEPC-Wasser gewaschen und das Pellet bei 7 500 g für 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand dekantiert und zurückbleibende Tropfen vorsichtig, ohne das Pellet zu berühren, mit 10 µl Pipettenspitzen durch den Kapillareffekt aufgenommen. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, bis es leicht durchscheinend erschien, dann in einer ausreichenden Menge (meist 20 µl) DEPC-Wasser aufgenommen und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren gelöst.

Nach dem gleichen Protokoll wurde die RNA-Isolierung aus 24-Well-Platten durchgeführt. Dazu wurden die verwendeten Volumina der Lösungen entsprechend heruntergesetzt:

TRI [®] -Reagenz	150 µl
Chloroform	30 µl
Isopropanol	75 µl

Die zusätzliche Isopropanol-Fällung wurde nicht durchgeführt, um in diesem kleinen Ansatz nicht zuviel RNA zu verlieren.

3.7.3 Isolierung der Poly(A⁺)-mRNA

① *mRNA ist gekennzeichnet durch eine Abfolge von Adenin-Nukleotiden am 3'-Ende, dem so genannten Poly(A⁺)-Schwanz. Viele verschiedene Systeme sind auf dem Markt, die die Hybridisierung komplementärer Desoxythymidin-Oligonukleotide (,Oligo(dT)') an den Poly(A⁺)-Schwanz ausnutzen. Zum Beispiel kann man diese Oligo(dT) an Polystyrole binden, mit der RNA mischen und inkubieren. Dabei bilden sich A-T-Basenpaare zwischen den Oligo(dT)s und den Poly(A⁺)-Schwänzen. Schickt man die Probe dann über eine Säule, werden die Polystyrol-Moleküle mit der gebundenen mRNA zurückgehalten, während die übrigen RNA-Moleküle die Säule passieren. Mit Hilfe eines Puffers mit niedriger Ionenstärke trennen sich die Poly(A⁺)-Oligo(dT)-Hybride, und die aufkonzentrierte mRNA kann von der Säule gewaschen werden.*

Materialien und Geräte

GenElute™ mRNA Miniprep Kit

Wasser, molekularbiologische Qualität

2X Binding Solution

Oligo(dT)-Polystyrol-Kügelchen

Waschlösung

Elutionslösung

Filtersäulen mit Auffanggefäßen

Sammel-Reaktionsgefäße

RNase-freie 1,5-ml-Reaktionsgefäße, autoklaviert

Heizblock, auf 70 °C vorgeheizt

Durchführung

In ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurden bis zu 500 µg Gesamt-RNA in einem maximalen Volumen von 250 µl überführt, und das Volumen wurde gegebenenfalls mit RNase-freiem Wasser zu 250 µl ergänzt. Zu dieser RNA-Lösung wurden 250 µl *Binding Solution* gegeben und kurz durch Schütteln gemischt. Dann wurden 15 µl der zuvor gut gemischten Oligo(dT)-Polystyrol-Kügelchen zur Probe pipettiert und gut auf dem Schüttler gemischt. Um die RNA zu denaturieren wurde die Probe bei 70 °C für 3 min auf dem Heizblock erhitzt. Anschließend blieb die Probe 10 min bei RT stehen, so dass sich die mRNA an die Oligo(dT)-Polystyrol-Kügelchen anlagern konnte. Diese Hybride wurden durch Zentrifugation bei 14 000 g

für 2 min pelletiert und der Überstand bis auf einen kleinen Rest von maximal 50 µl verworfen, um das Pellet nicht zu zerstören. Das Pellet wurde in 500 µl Waschlösung durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, bevor die Probe auf die Säule geladen wurde. Um das Durchfließen der Probe durch die Säule zu beschleunigen, wurde die Säule mit der Probe bei 14 000 g für 2 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Waschlösung ebenfalls durch Zentrifugation bei 14 000 g für 2 min gewaschen. Danach wurde die Säule auf ein Sammel-Reaktionsgefäß gesetzt und 50 µl der auf 70 °C vorgewärmten Elutionslösung mittig auf die Säule gegeben. Nach etwa 5 min Inkubation bei RT wurde der Ansatz für 1 min bei 14 000 g zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde mit weiteren 50 µl vorgewärmter Elutionslösung wiederholt. Das Eluat mit der aufkonzentrierten mRNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.7.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren

UV-Quantifizierung

① *Die Konzentration von Nukleinsäuren in Lösung lässt sich mittels UV-Spektroskopie bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm bestimmen. Eine Extinktionseinheit bei 260 nm (E_{260}) entspricht etwa 33 µg/ml Oligonukleotid, 40 µg/ml RNA bzw. 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Um eine hinreichend genaue Messung zu gewährleisten, sollte im Bereich zwischen $E = 0,1$ bis $E = 1,5$ gemessen werden. Für Messungen im UV-Bereich zwischen 200 und 400 nm müssen Quarzküvetten verwendet werden, da Glas und Kunststoff bei dieser Wellenlänge absorbieren.*

Proteine absorbieren etwa bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm, abhängig von ihrer Aminosäuresequenz, so dass sich bei $\lambda = 280$ nm die Absorptionen von Nukleinsäuren und Proteinen überlagern. Die Reinheit einer isolierten Nukleinsäure kann mit Hilfe des Quotienten E_{260}/E_{280} abgeschätzt werden, der bei einer sauberen Präparation zwischen 1,8 und 2,0 liegt. Dieser Quotient wiederum ist sehr pH-abhängig, so dass die Nukleinsäuren für die UV-Messung mit einem niedrig-salzigen Puffer (z. B. 10 mM Tris-HCl, pH 7,5) verdünnt werden sollen, der ebenfalls als Referenz benutzt wird.

Zu beachten ist ebenfalls, dass Phenol ein Absorptionsmaximum zwischen $\lambda = 270$ bis $\lambda = 275$ nm hat. Aus der RNA-Isolierung stammende Phenol-Kontaminationen verfälschen das UV-Ergebnis so, dass höhere Konzentrationen und höhere Reinheiten vermutet werden, da bei $\lambda = 260$ außer der Absorption von Nukleinsäuren noch Phenol gemessen wird.

Materialien und Geräte

UV/VIS-Spektrometer Ultrospec[®] 2100 pro, Amersham Pharmacia
Biotech, Uppsala, Schweden

Suprasil[®] Quarzglas Präzisionsküvetten, Hellme, Mülheim, Deutschland
1X TE für UV-Quantifizierung
zu bestimmende Nukleinsäurelösung

Durchführung

Die Nukleinsäurelösungen wurden 1:100 in 1X TE-Puffer pH 7,5 verdünnt und 100 µl in Mikroküvetten aus Quarzglas im Nukleinsäuremodus des Spektrometers bei 260 nm, 280 nm und 320 nm vermessen.

Nukleinsäure-Quantifizierung mit Hilfe von PicoGreen[®]

Materialien und Geräte

PicoGreen[®] dsDNA Quantitation Kit

20X TE pH 7,5

PicoGreen[®]-Reagenz

λ -DNA [100µg/ml in 1X TE]

Ampuwa

zu bestimmende DNA-Lösung

POLARstar Galaxy, bmg LabTech GmbH, Offenburg

Durchführung

Eine ausreichende Menge 20X TE-Puffer wurde 1:20 zu 1X TE-Puffer in Ampuwa verdünnt. Das PicoGreen[®]-Reagenz wurde 1 : 200 mit 1X TE-Puffer zur PicoGreen[®]-Lösung und die λ -DNA abhängig von dem Konzentrationsbereich der Standardkurve 1 : 200 (50 ng/ml, *Low Range*) oder 1 : 50 (2 µg/ml, *High Range*) mit 1X Te-Puffer verdünnt wurde. Eine

5-Punkt-Standardkurve wurde mit Konzentrationsbereichen von 2 ng/ml bis 2 µg/ml (*High Range*) bzw. 50 pg/ml bis 50 ng/ml (*Low Range*) jeweils mit 1X TE-Puffer als Blank hergestellt. Je Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 100 µl dieser Standardlösungen in Duplikaten vorgelegt. Ebenfalls in Duplikaten wurden je 100 µl der zu bestimmenden DNA-Lösung in entsprechende Wells der Multiwellplatte pipettiert. Anschließend wurden zu jedem Well 100 µl der PicoGreen®-Lösung zugegeben und gemischt. Nach einer 2- bis 5minütigen, lichtgeschützten Inkubation der Platte folgte die Fluoreszenzmessung der Lösung im POLARstar bei einer Exzitationswellenlänge von $\lambda = 485$ nm und einer Emissionswellenlänge von $\lambda = 520$ nm.

3.7.5 Agarose-Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Denaturierende RNA-Gele

① *RNA-Moleküle bilden komplexe und oft sehr stabile Sekundärstrukturen aus. Um sie der Größe nach aufzutrennen, müssen sie vollständig denaturiert werden. Dies kann mit Formaldehyd geschehen, das mit den Aminogruppen der Nukleotide A, G und C Schiff'sche Basen ausbildet. Die Aminogruppen dieser Basen stehen dann nicht mehr zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die für die Sekundärstrukturen nötig sind, zur Verfügung. Daher wird sowohl den RNA-Proben vor dem Erhitzen als auch dem Gel Formaldehyd zugesetzt.*

Materialien und Geräte

DEPC-Wasser

10X Hepes-Puffer

1X Hepes-Laufpuffer

Formaldehyd 37 %

Formamid

Gel-Ladepuffer

Glycerin

SYBR®GreenII-Lösung

RNA Ladder High Range, #SM0421, Fermentas Life Sciences

[0,5 mg/ml RNA in 20 mM NaAc pH 4,5]

Seakem[®] LE Agarose

Bio-Rad Mini-Sub[®] Cell GT, Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Bio-Rad Power Pac 200, Bio-Rad

Blockthermostat

Durchführung

Für jede auf dem RNA-Gel zu untersuchende Probe wurden die in Tabelle 3.1 angegebenen Reagenzien in einem autoklavierten, RNase-freien Reaktionsgefäß gemischt. Die Proben wurden dann 5 min im Blockthermostat auf 65 °C erhitzt und anschließend sofort bis zum Laden des Gels auf Eis gelagert. Vor dem Laden wurden jeder Probe noch 1,0 µl SYBRGreenII-Lösung zugesetzt.

Tabelle 3.1: Probenmix für RNA-Gele.

Reagenz	Volumen
RNA	1 µg
10X Hepes-Puffer	0,8 µl
Formamid	2,5 µl
Formaldehyd 37 %	1,1 µl
Gel-Ladepuffer	0,5 µl
DEPC-Wasser	ad 8,0 µl

Für das 1,2%ige Agarose-RNA-Gel wurden 0,72 g Agarose in 54 ml DEPC-Wasser suspendiert und in der Mikrowelle aufgekocht. Dazu wurde das Becherglas mit einem Uhrglas bedeckt, um den Flüssigkeitsverlust zu minimieren. Nach dem Aufkochen wurde das Becherglas auf einen Magnetrührer gestellt, und die Lösung mit Hilfe eines Rührfisches durchgemischt. Die Agarosesuspension wurde erneut aufgekocht, bis die Lösung klar und die Agarose gelöst waren. Die Lösung wurde weiter langsam auf dem Magnetrührer gerührt und etwas abkühlen gelassen, bevor 6 ml 10X Hepes-Puffer hinzugegeben und vermischt wurden.

Sobald die Lösung soweit abgekühlt war, dass eine dünne Hautschicht auf der Oberfläche entstanden war, wurde diese mit Hilfe einer Pipettenspitze vorsichtig entfernt. Unter kontinuierlichem Rühren auf dem Magnetrührer wurden 1,1 µl 37%iges Formaldehyd hinzugegeben, bevor die Agaroselösung in die mit Kämmen vorbereitete Gelgießform gegossen wurde.

Eventuell entstandene Blasen wurden mit Hilfe einer Pipettenspitze vorsichtig entfernt. Nach dem Mischen wurde die Agaroselösung in die vorbereitete Gelgießform gegossen.

Die Elektrophoresekammer wurde mit 1X Hepes-Laufpuffer gefüllt, und nachdem das Gel völlig erstarrt war, wurde es in die Kammer eingesetzt und vollständig mit dem Laufpuffer bedeckt. Erst dann wurden vorsichtig die Kämme entfernt und die Geltaschen konnten mit den vorbereiteten Proben beladen werden. Dazu wurde eine Pipette auf ein etwas größeres Volumen als geladen werden sollte eingestellt. Als erstes wurde etwas Luft und erst dann die Probe aufgezogen, damit sichergestellt wurde, dass die komplette Probe in die Tasche geladen werden konnte. Anschließend wurde die Kammer angeschlossen und das Gel bei 100 V für 45 min laufen gelassen.

DNA-Gele

Materialien und Geräte

Bio-Rad Mini-Sub[®] Cell GT, Bio-Rad

Bio-Rad Power Pac 200, Bio-Rad

Seakem[®] LE Agarose, Cambrex BioScience

Biozym Agarose DNA, Biozym, Hessisch Oldendorf

1X TAE-Puffer

GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder, #SM0311, Fermentas Life Sciences

[0,5 µg/µl] mit 6X *Loading Dye*

GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder ready-to-use, #SM0243, Fermentas Life Sciences [0,1 µg/µl]

SybrGreenII-Lösung

Durchführung

In der Regel wurde ein kompletter 10-µl-PCR-Ansatz für das Auftragen auf das Gel vorbereitet. Dazu wurde ein *Loading Dye/SYBRGreenII*-Mix hergestellt, der aus zwei Teilen Loading Dye und einem Teil SybrGreenII-Lösung bestand. 3 µl dieses Mixes wurden zu jedem 10-µl-PCR-Ansatz pipettiert. Für die meist nicht-quantitativen Gelanalysen reichte es aus, die Tasche eines Gels mit diesen so vorbereiteten Proben zu füllen und den Rest zu verwerfen. Die *ready-to-use DNA Ladder* konnte ohne weitere Vorbereitung in die Tasche geladen werden. Die *1 kb DNA Ladder* wurde vor

dem Laden auf das Gel 1:4 mit dem *Loading Dye/SYBRGreenII*-Mix versetzt.

Meist wurde die Agarose für RNA-Gele in einer Konzentration von 2,0 % (m/v) eingesetzt. Diese Konzentration deckt Fragmentgrößen von 0,1 bis 2 kb ab. Die verwendete Gelkammer fasst 60 ml. Dazu wurden 3 g Agarose in 60 ml 1X TAE suspendiert, das Becherglas mit einem Uhrglas abgedeckt und ebenfalls wie bei RNA-Gelen in der Mikrowelle aufgeköcht, bis die Lösung klar war. War diese auf dem Magnetrührer bei langsamem Rühren soweit abkühlt, dass eine dünne Hautschicht auf der Oberfläche entstand, wurde die Hautschicht mit Hilfe einer Pipettenspitze entfernt und die Agaroselösung in die mit Kämmen vorbereitete Gelgießform gegossen.

Als Laufpuffer wurde bei DNA-Gelen ein 1X TAE-Puffer verwendet, der in die Kammer gegossen wurde. Nach dem Einsetzen des vollständig erstarrten Gels in die Kammer wurde soviel 1X TAE dazugegeben, dass das Gel vollständig mit Laufpuffer bedeckt war. Erst dann wurden die Kämmen vorsichtig entfernt und die vorbereiteten DNA-Proben in die Geltaschen geladen.

Auswertung der Gele

① *Um die Nukleinsäuren in den Agarosegelen sichtbar zu machen, wurde den Proben vor dem Laden in die Geltaschen SybrGreenII zugesetzt. Eine Alternative ist, die Nukleinsäuren nach der Elektrophorese in einer Färbelösung zu inkubieren. Dies ist jedoch von der Handhabung deutlich schwieriger und damit verbunden, das große Volumina von SYBRGreenII-Lösungen anfallen. Ein weiterer Vorteil SybrGreenII-Zusatzes zu den Proben ist, dass man sich jederzeit die Banden auf dem Gel anschauen und bei Bedarf das Gel noch weiter laufen lassen kann.*

Wie das schon lange gebräuchliche Ethidiumbromid ist SYBR Green II eine Substanz, die zwischen den Basen der Nukleinsäure interkaliert, wodurch die Fluoreszenz von SYBRGreenII bei Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht wird. So erscheinen DNA- und RNA-Banden auf dem Agarosegel als hell leuchtende Streifen.

Materialien und Geräte

Intas Multi-Darkbox, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Intas UV-Kasten (Weißlicht und 312 nm UV)
Intas Manuelles Zoom Objectiv
Sony Intas Video Graphic Printer UP-890CE

Durchführung

Das Gel wurde auf den UV-Kasten gelegt, die Tür der Multi-Darkbox geschlossen und das UV-Licht von außen angeschaltet. Nach dem Scharfstellen des Bildes, was über den angeschlossenen Monitor betrachtet werden konnte, konnte das Bild auf Diskette gespeichert bzw. über den angeschlossenen Graphic Printer ausgedruckt werden.

Entsorgung

Alle mit SYBRGreenII und Ethidiumbromid kontaminierten Gele und Lösungen wurden im Zytostatika-Abfall entsorgt.

3.7.6 Alkoholfällung von Nukleinsäuren

① *Versetzt man Nukleinsäuren mit monovalenten Salzen, gibt Alkohol dazu und mischt, fallen die Nukleinsäuren aus und können durch Zentrifugation pelletiert werden. Neben dem hier verwendeten Natriumacetat finden noch andere Salze Anwendung. Bei der Auswahl des verwendeten Salzes ist darauf zu achten, dass dessen Ionen Enzyme nachfolgender Reaktionen stören können. Ethanol hat gegenüber Isopropanol den Vorteil, dass es rasch verdampft, jedoch sind deutlich höhere Alkoholkonzentrationen nötig.*

Materialien und Geräte

Natriumacetat-Puffer 3 M, pH $5,2 \pm 0,1$ (25 °C)

Ethanol absolut p. a., -20 °C

Durchführung

Ein Teil der Nukleinsäurelösung wurde mit drei Teilen eiskaltem Ethanol und 1/10 Teil Natriumacetat-Puffer versetzt. Die Lösung wurde gemischt und für mindestens 1 h bei -80 °C gelagert. Die präzipitierten Nukleinsäuren konnten durch Zentrifugation bei 4 °C für 20 min bei 12 000 g pelletiert werden. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet an der Luft getrocknet.

3.8 Quantitative *Real-time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

3.8.1 cDNA-Synthese

① Die cDNA-Synthese wird durch Reverse Transkriptase katalysiert, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die mRNA als Matrize benutzt und einen komplementären DNA-Strang aufbaut. Produkt dieser Synthese ist ein Hybrid aus RNA und DNA. Die Abkürzung cDNA steht für ‚complementary‘ DNA, die komplementär zur RNA ist und im Gegensatz zu genomischer DNA keine Intronsequenzen mehr enthält.

Materialien und Geräte

Opticon DNA Engine, MJ Research, Waltham, MA

isolierte, quantifizierte Gesamt-RNA

High-Capacity cDNA Archive Kit

Reverse-Transkriptase-Puffer

25X dNTPs

MultiScribe™-Reverse-Transkriptase [50 U/μl]

Oligo-dT-Primer, O4387, Sigma [70 μM]

Ampuwa

QuantiTect-SybrGreen-Master-Mix

PCR-Reaktionsgefäße, Biozym Scientific GmbH

Art.Nr. 712050 (8er-Streifen, farblos)

Art.Nr. 712060 (8er-Streifen, weiß)

Art.Nr. 712100 (ultraklare Deckel)

PCR-Reaktionsgefäße, Abgene, Epsom, UK

AB-0700/w (96er-Platten, weiß)

AB-0771/w (8er-Streifen, weiß)

AB-0866 (ultraklare Deckel für Platten und Streifen)

Filterspitzen

2,5 μl *Safe Sale-Tips*, Biozym

0,5 – 10 μl *Filter Tips*, S1121-4810, Starlab GmbH, Ahrensburg

1 – 100 μl *Bevelled Filter Tips*, S1120-1840, Starlab GmbH

0,2-ml-Reaktionsgefäße

0,5-ml-Reaktionsgefäße

1,5-ml-Reaktionsgefäße

Durchführung

Folgender in Tabelle 3.2 dargestellter 20- μ l-Reaktionsansatz wurde pro umzuschreibender Gesamt-RNA in einem farblosen 0,2-ml-PCR-Reaktionsgefäß zusammen pipettiert:

Tabelle 3.2: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription.

Reagenz	Volumen bzw. Menge	finale Konzentration
Gesamt-RNA	2,0 μ g	0,1 μ g/ μ l
10X Reverse-Transkriptase-Puffer	2,0 μ l	1X
25X dNTPs	0,8 μ l	1X
Oligo-dT-Primer	1,0 μ l	3,5 μ M
MultiScribe™-Reverse-Transkriptase	0,4 μ l	1 U/ μ l
Ampuwa	ad 20,0 μ l	-

Für die Reverse Transkription wurden die Ansätze bei 37 °C über 2 h inkubiert und anschließend für folgende PCR-Reaktionen in der Regel 1:10 mit 1X TE-Puffer pH 7,5 verdünnt und in ein 0,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die cDNA konnte im Kühlschrank gelagert werden.

3.8.2 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

① *Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine der wichtigsten Methoden in der Molekularbiologie. Sie wurde Mitte der 80er Jahre des 20. Jahrhunderts vom Amerikaner Kary Mullis erfunden und hat seitdem die Gentechnik revolutioniert. Mit Hilfe der PCR, Abkürzung für die englische Bezeichnung „polymerase chain reaction“, ist es möglich, DNA in vitro zu kopieren. Dieser als Amplifikation bezeichnete Vorgang verläuft exponentiell.*

Bei der PCR synthetisiert eine DNA-Polymerase, ausgehend von Startermolekülen (Primern), einen neuen DNA-Strang an einer einzelsträngigen Nucleinsäure-Matrize (Template). Das entscheidende Prinzip der PCR ist die zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte, so dass die Matrize exponentiell amplifiziert wird.

Ein Zyklus beginnt mit der thermischen **Denaturierung** des zu amplifizierenden Doppelstranges, d. h. bei 95 °C wird der Doppelstrang in seine Einzelstränge getrennt. Die Denaturierungsdauer sollte recht kurz gewählt werden, da die hohe Temperatur zu einer Denaturierung der Polymerase, DNA und der Primer führt und Nukleotide zerfallen. Dennoch muss sichergestellt sein, dass die Temperatur ausreichend lang (5 sec reichen) in der Probe gehalten wird.

Darauf folgt bei 50 bis 65 °C die Hybridisierung der in massivem Überschuss eingesetzten Primer an den Matrizen-Einzelstrang, auch **Annealing** genannt. Als Primer werden kurze Oligonukleotide eingesetzt. Die kritischen Parameter für deren optimale Sequenz werden später beschrieben. Die genaue Annealingtemperatur richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer und sollte etwa 5 °C darunter gewählt werden. Denn die Schmelztemperatur der Primer gibt die Temperatur an, bei der 50 % der Primer nicht mehr an das Template binden. Um eine zuverlässige Hybridisierung der Primer zu gewährleisten, liegt die Annealingtemperatur darunter.

Der Startpunkt für die DNA-Polymerase ist ein an einen Einzelstrang gebundener Primer, von dessen 3'-Ende aus ein komplementärer Strang bei 72 °C, dem Temperaturoptimum für die Polymerase, synthetisiert wird. Der Schritt der Primerverlängerung – und damit die Synthese des neuen Stranges – wird **Elongation** genannt. Die Elongationszeit ist abhängig von der erwarteten Produktlänge und dem verwendeten Enzym. Bei Taq-Polymerasen rechnet man mit 0,5 bis 1 min je kb Länge des Produktes. Ist die Elongationszeit zu lang gewählt, kann die Polymerase unspezifische Produkte synthetisieren. Bei einer zu kurzen Elongationszeit ist das Produkt zu kurz und es fehlt die Primerbindungsstelle am neuen Strang, so dass sich dieser der weiteren exponentiellen Amplifikation entzieht.

Ein Zyklus besteht demnach aus den Schritten Denaturierung – Annealing – Elongation. Die **Zyklenzahl** richtet sich nach der Quantität der zu detektierenden cDNA. Je mehr cDNA ursprünglich vorlag, desto eher überschreitet die gemessene Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz, umso eher lässt die Effizienz der Reaktion nach und die Fluoreszenzkurve erreicht ihre Plateauphase. Als Ursachen der Plateauphase werden eine Akkumulation des PCR-Produkts Pyrophosphat, das die Polymerase hemmt, ein verändertes DNA-Strang zu Primer-Verhältnis, das das Reannealing

zweier fertiger Stränge fördert und eine abnehmende Menge intakter Polymerase diskutiert.

Einen deutlichen Einfluss auf die Effizienz der PCR hat die Zusammensetzung des verwendeten Puffers. Das Aktivitätsoptimum der Taq-Polymerase liegt bei einem pH oberhalb von acht. Auch die Salzkonzentrationen spielen eine große Rolle, so beeinflusst die $MgCl_2$ -Konzentration nicht nur das Primerannealing, sondern auch die Denaturierung, die Produktspezifität, die Bildung von Primerdimeren und die Fehlerrate der Polymerase. Bei der Verwendung handelsüblicher Kits ist der optimale **Puffer** bereits mitgeliefert, und es bedarf in der Regel hier keiner Optimierung.

Die **Nukleotidkonzentration** der Standard-PCR liegt bei $200\ \mu M$ je Nukleotid. Zu hohe Nukleotidkonzentrationen haben eher eine inhibierende Wirkung auf die Polymerase, da die Nukleotide freie Mg^{2+} -Ionen binden, die so dem Reaktionsmedium entzogen werden.

Die **Primerkonzentration** kann einen erheblichen Einfluss auf die Effizienz haben. Es kommt auch vor, dass ein Primer besser bindet als der andere und daher verschiedene Primerkonzentrationen kombiniert werden müssen. Die Standardkonzentration je Primer liegt bei $500\ nM$.

Die klassische Polymerase ist die **Taq-Polymerase**, die aus dem hitzestabilen Bakterienstamm *Thermophilus aquaticus* isoliert wurde. Sie besitzt neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität auch eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität, so dass sie mit Sonden kombinierbar ist, aber keine 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Eingesetzt wird ein Unit (U) pro $50\ \mu l$ Reaktionsansatz. Neben der normalen, Template-abhängigen Polymeraseaktivität besitzt sie noch eine Template-unabhängige Polymeraseaktivität, die an den neu synthetisierten Strang am Ende häufig noch ein zusätzliches Nukleotid anhängt, meist ein ATP. Dies wird z. B. beim Klonieren von PCR-Produkten ausgenutzt. Die Prozessivität der Taq-Polymerase, darunter versteht man die Zahl der Nukleotide, die eine Polymerase in einem Ansatz an das 3'-Ende einer DNA synthetisiert bevor sie wieder abdissoziiert, liegt bei 35 bis 100 Nukleotiden. Die DNA-Syntheserate liegt bei ca. 2 800 Nukleotiden pro Minute.

Proofreading-Polymerasen sind wesentlich temperaturstabiler als Taq-Polymerasen. Im Gegensatz zu den Amplifikationsprodukten der Taq-Polymerasen besitzen ihre Produkte glatte Enden. Proofreading-Polymerasen

haben jedoch eine deutlich geringere Prozessivität von neun bis zwölf Nukleotiden und eine Syntheserate von ca. 550 Nukleotiden pro Minute. Daher wird empfohlen, deutlich höhere Enzymmengen als bei Taq-Polymerasen einzusetzen. Ihr großer Vorteil liegt in der zusätzlichen 3'-5'-Exonukleaseaktivität, die eine Korrekturaktivität („proofreading“) erlaubt. Dadurch sinkt die Fehlerrate um den Faktor zehn auf etwa einen Fehler pro 10^7 Basen. Das hat zur Folge, dass nur etwa 3 % der neu generierten Fragmente nach 30 PCR-Zyklen eine Mutation tragen im Gegensatz zu 25 % der mit Taq-Polymerasen synthetisierten Fragmente.

3.8.3 Primer

Primerdesign

① Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit der PCR hängen in hohem Maße vom Design der verwendeten Primer ab. Die Beachtung folgender Parameter erhöht die Wahrscheinlichkeit, funktionierende Primersequenzen zu erhalten:

- In der Regel haben sie eine Länge von 18 bis 30 Nukleotiden und einen G/C-Gehalt (Guanin und Cytosin) zwischen 40 und 60 %.
- Um Fehlhybridisierungen und Leserasterverschiebungen zu vermeiden, sollten Basenwiederholungen von mehr als vier gleichen Basen vermieden werden.
- Die Schmelztemperatur sollte zwischen 58 und 80 °C liegen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu gewährleisten. Beide Primer eines Primerpärchens sollten ähnliche Schmelztemperaturen besitzen, um optimale PCR-Bedingungen wählen zu können.
- Am 3'-Ende fördern ein bis zwei G oder C die Bindung an den komplementären Nukleotidstrang, so dass die Polymerase optimal arbeiten kann; drei und mehr G oder C jedoch stabilisieren falsch gebundene Primer und es steigt die Gefahr unspezifischer Amplifikationsprodukte. Ein T am 3'-Ende fördert Basenfehlpaarungen und ist zu vermeiden.
- Die Primersequenz sollte möglichst spezifisch für das zu amplifizierende Produkt sein, sonst steigt wiederum die Gefahr unspezifischer Amplifikationsprodukte.

- *Primer sollten weder stabile Sekundärstrukturen wie Haarnadeln („hair pins“) noch Dimere ausbilden, so dass sie während des Annealingschrittes optimal an den Einzelstrang binden können. Besitzen die Primer eine zu hohe Komplementarität an ihren 3′-Enden, kann der eine Primer als Template für den anderen dienen, Primerdimere bilden sich und die für das Annealing mit dem zu amplifizierenden Nukleotidstrang zur Verfügung stehende Primermenge wird drastisch reduziert. Dies hat zur Folge, dass die Effizienz der Reaktion zu gering wird.*

Durchführung

Das Primerdesign wurde mit Hilfe des online frei zugänglichen Primer-Design-Programmes Primer3⁸⁰ durchgeführt. Dazu wurde die mRNA-Sequenz des mit PCR zu quantifizierenden Genes benötigt, die aus der NCBI Reference Sequence (RefSeq)-Datenbank herunter geladen werden konnte. Primer3 berücksichtigt die zuvor genannten Kriterien und man kann sie manuell verändern. Die in Primer3 vorgeschlagenen Parameter wurden in folgenden Punkten geändert:

Mispriming Library:	Human
Product Size Ranges:	80-130
Number to Return:	20
Primer Size:	Min: 18 Opt: 20 Max: 22
Primer GC%:	Min: 45 Opt: 50 Max: 55
Max Poly-X:	3 (Anzahl gleicher Nukleotide)
CG Clamp:	1 (endständiges C oder G)

Ergaben diese Einstellungen keine akzeptablen Primersequenzen, wurden diese abhängig von der vorgegebenen Sequenz erweitert. War die Sequenz z. B. sehr GC-reich, wurde das Maximum für den GC-Gehalt hoch gesetzt. Die Primer entsprechend den ermittelten Primersequenzen wurden in der Regel von der Firma Operon Biotechnologies GmbH, Köln, in der Qualitätsstufe „salzfrei“ synthetisiert.

Optimierung der einzusetzenden Primerkonzentration

Um zu überprüfen, ob der linke und der rechte Primer mit etwa gleichem Ausmaß binden und dadurch die Synthese des neuen Stranges in etwa mit

gleicher Effizienz ermöglichen, wurde jedes Primerpärchen zu Beginn mittels PCR getestet. Anstatt der üblichen Primerkonzentration beider Primer von 500 nM wurden zwei Reaktionsansätze angesetzt. Der erste Ansatz enthielt 250 nM des linken und 750 nM des rechten Primers und der zweite Ansatz 750 nM des linken und 250 nM des rechten Primers. Wenn beide Reaktionsansätze etwa gleiche C_T -Werte erreichten, wurde bei anschließenden PCR-Reaktionen von beiden Primern eine Konzentration von 500 nM eingesetzt. War jedoch ein deutlicher Unterschied (> 1 Zyklus) zwischen beiden Reaktionsansätzen zu erkennen, wurden erneut zwei PCR-Reaktionen angesetzt.

Ausgehend von dem Reaktionsansatz, der zuvor den kleinen C_T -Wert hervorbrachte, wurden nun von dem Primer, der zuvor in der Konzentration 250 nM eingesetzt wurde, 500 nM eingesetzt; 750 nM des anderen Primers blieben erhalten. Dieser Ansatz wird mit dem üblichen Reaktionsansatz mit einer Primerkonzentration beider Primer von je 500 nM verglichen. Wenn beide Reaktionsansätze in etwa gleiche C_T -Werte erreichten, wurde im Folgenden die übliche Primerkonzentration von 500 nM je Primer eingesetzt. Erreichte der Reaktionsansatz mit der Konzentrations-Kombination von 500 nM des einen und 750 nM des anderen Primers einen deutlich kleineren C_T -Wert, wurden diese Primerkonzentrationen bei nachfolgenden PCR-Reaktionen eingesetzt.

PCR-Effizienz

Eine Möglichkeit, die Effizienz einer PCR-Reaktion zu bestimmen, ist es, eine Verdünnungsreihe von aufgereinigter cDNA herzustellen und diese mittels PCR zu amplifizieren. Da der PCR-Reaktion ein exponentieller Verlauf zugrunde liegt, führt eine Verdopplung der cDNA-Menge des Templates zu einem um eins geringeren C_T -Wert. Trägt man die logarithmierte cDNA-Menge gegen die erhaltenen C_T -Werte auf, ergibt sich eine Gerade mit einer Steigung. Verläuft die PCR-Reaktion mit einer Effizienz von 100 %, d. h. dass sich die DNA-Menge pro Zyklus exakt verdoppelt, hat die Gerade die Steigung -3,3. Aus der Steigung der Geraden lässt sich mit Hilfe der Gleichung 3.4 die Effizienz errechnen.

$$\text{Effizienz } E = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1$$

Gleichung 3.4

Dabei sind Steigungen von $-3,33 \pm 0,3$ in der Regel zu akzeptieren.

3.8.4 Real-Time PCR

① Mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes SybrGreen I (Strukturformel siehe Abbildung 3.10) ist es möglich, die Amplifikation der DNA in Echtzeit („real time“) zu verfolgen. SybrGreen I lagert sich unspezifisch in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA-Helix ein, wodurch sich seine Fluoreszenz etwa 1 000fach verstärkt. Da mit jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird, steigt die Fluoreszenz exponentiell an und kann nach jedem Zyklus gemessen werden.

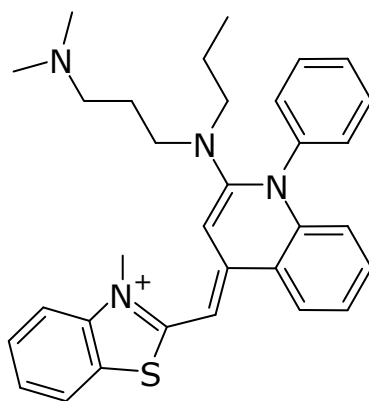


Abbildung 3.10: Strukturformel des Fluoreszenz-Farbstoffes SybrGreen I.

In Abbildung 3.11 ist die Fluoreszenzkurve einer PCR-Reaktion abgebildet. Aufgetragen ist die gemessene Fluoreszenz nach jedem Zyklus gegen die Zyklenzahl. Die abgebildete Kurve ist Basislinien-subtrahiert, wobei als Basislinie der Durchschnitt der Zyklen 3 bis 10 genommen worden ist. Um verschiedene Proben miteinander vergleichen zu können, bestimmt man von jeder Probe den so genannten C_T -Wert. Dies ist der gebrochene PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzintensität einen festgesetzten Schwellenwert, den so genannten threshold, überschreitet.

Um die Höhe des „threshold“ zu bestimmen betrachtet man die PCR-Kurve, wie z. B. in Abbildung 3.11 A dargestellt. Der „threshold“ wird oberhalb der Basislinie in den exponentiellen Teil der Kurve gelegt. Besser zu sehen ist dieser mit logarithmierter Fluoreszenzachse wie in Abbildung 3.11 B. Optimal wird der „threshold“ in die Mitte des log-linearen Bereichs gelegt, da man dort sicher ist, dass man sich noch im exponentiellen Bereich der Reaktion befindet. Abhängig von der eingesetzten Template-Menge wird

der C_T -Wert früher (bei viel Ausgangs-cDNA) oder später (bei weniger cDNA) überschritten, und der Vergleich der C_T -Werte lässt einen Vergleich der Ausgangs-mRNA-Mengen zweier Proben zu.

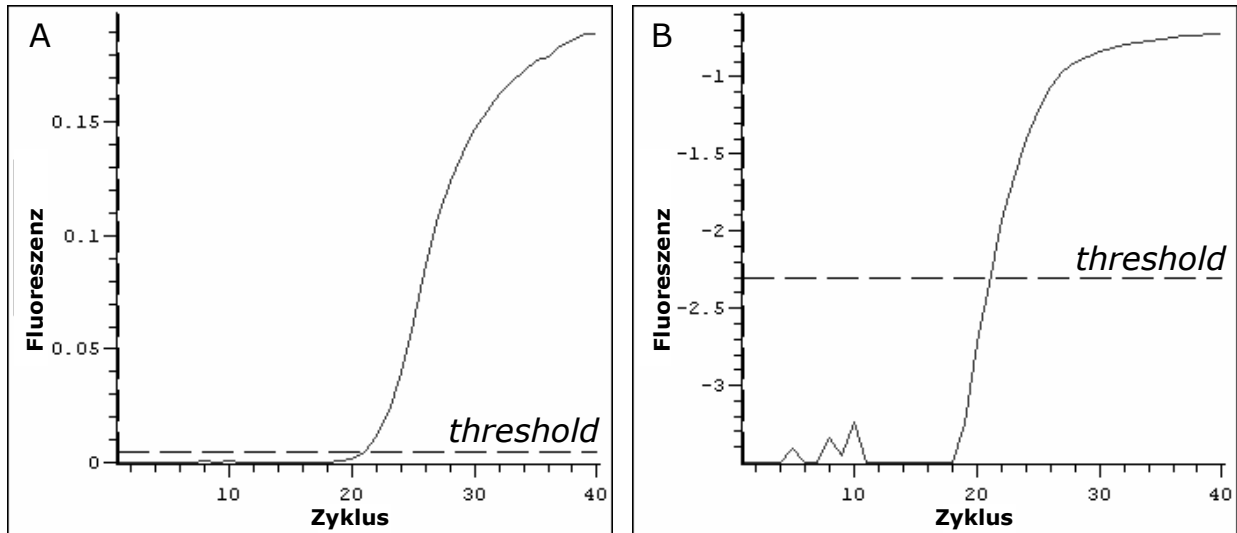


Abbildung 3.11: Fluoreszenz-Zyklus-Kurve einer PCR-Reaktion. Eingetragen ist der *threshold* bei 0,005 Fluoreszenzeinheiten mit linearer (A) und logarithmischer (B) Skalierung der Fluoreszenzachse. Die Kurven sind basisliniensubtrahiert, als Basislinie wurde die Fluoreszenz der Zyklen 3 bis 10 genommen.

Da sich SybrGreenI unspezifisch in die DNA-Doppelhelix einlagert, ist es notwendig, im Anschluss an die PCR-Reaktion eine Schmelzpunktanalyse durchzuführen. Damit können die korrekten Produkte von Artefakten und Primerdimeren unterschieden werden. Bei der Schmelzpunktanalyse wird die Temperatur des Reaktionsansatzes schrittweise erhöht und die DNA-Doppelstränge trennen sich entsprechend ihrer Schmelzpunkte auf. Bei einem einzigen Produkt ergibt sich ein massiver Fluoreszenzabfall in einem engen Temperaturbereich, wie z. B. in Abbildung 3.12 dargestellt. Um die Fluoreszenzabnahme besser zu erkennen, ist die erste Ableitung der Kurve mit aufgetragen. Mit Hilfe der Ableitung lässt sich der exakte Schmelzpunkt auf der x-Achse abgreifen.

Primerdimere haben normalerweise einen deutlich niedrigeren Schmelzpunkt von etwa 75 °C, und die Kurve der Ableitung ist deutlich breiter als bei den höher schmelzenden, gewünschten PCR-Produkten.

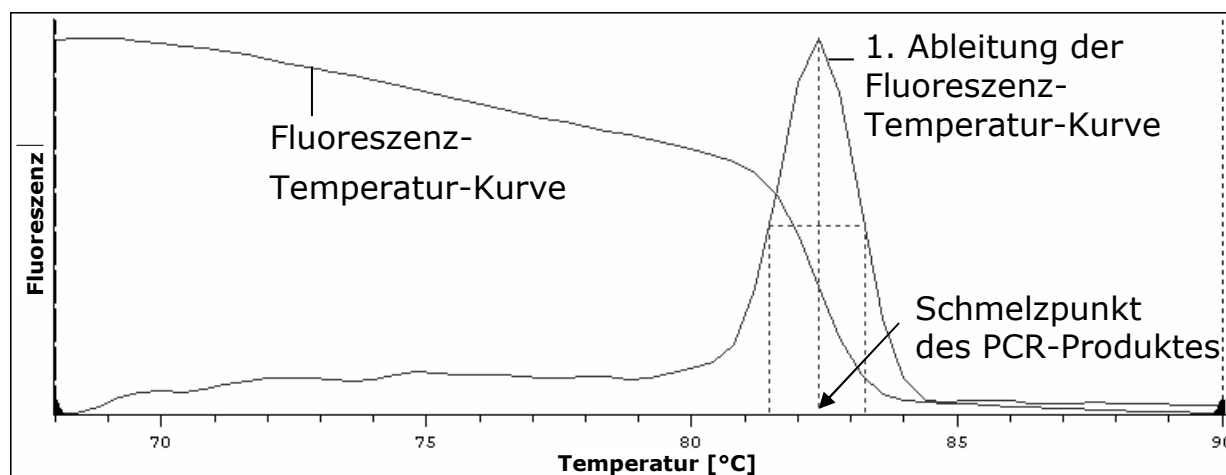


Abbildung 3.12: Schmelzpunktanalyse eines PCR-Produktes. Das Maximum der 1. Ableitung der Fluoreszenz-Temperatur-Kurve zeigt den Schmelzpunkt des PCR-Produktes an.

Materialien und Geräte

Opticon

QuantiTect SYBR Green PCR Kit

2X QuantiTect-SYBR-Green-PCR-Master Mix

Primer-Mischungen der zu untersuchenden Gene

Verdünnte cDNA der Reversen Transkription (s.3.8.1)

PCR-Plastikware (siehe 3.8.1)

Durchführung

Als Template wird in der PCR die DNA bezeichnet, die zu amplifizieren ist, bei den *Real-Time*-Expressionsstudien ist es die verdünnte cDNA der Reversen Transkription (s. 3.8.1). Für einen 12- μ l-PCR-Ansatz wurden die in Tabelle 3.3 aufgeführten Reagenzien zusammen pipettiert.

Tabelle 3.3: Reaktionsansatz für PCR mit QuantiTect-SYBR-Green (Qiagen).

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
Template	1,2 μ l	-
Primer-Mischung	4,8 μ l	500 nM je Primer
2X QuantiTect-SybrGreen-Master-Mix	6,0 μ l	1X
Gesamtvolumen	12,0 μ l	-

Um den Pipettieraufwand und die durch mehrere Pipettierschritte erhöhte Pipettiergenauigkeit zu minimieren, wurde das Template mit dem 2X SybrGreen-Master-Mix in der benötigten Zahl der Reaktionsansätze (plus etwa 10%igem Schwundüberschuss) gemischt. Die einzelnen Gene wurden pro Probe im Duplikat untersucht. Für alle Pipettierschritte wurden die PCR-Gefäße in Eiswasser gelagert, um eine Verdunstung der kleinen Probenvolumina zu verhindern. Pro Well wurden je 7,2 μl der Template/SybrGreen-Mischung vorgelegt, bevor 4,8 μl der Primer-Mischung um einen Winkel von etwa 90° versetzt zum Template in die PCR-Gefäße pipettiert wurden. Pro Template/SybrGreen-Mischung und pro Primer-Mischung wurde so nur eine Pipettenspitze benötigt.

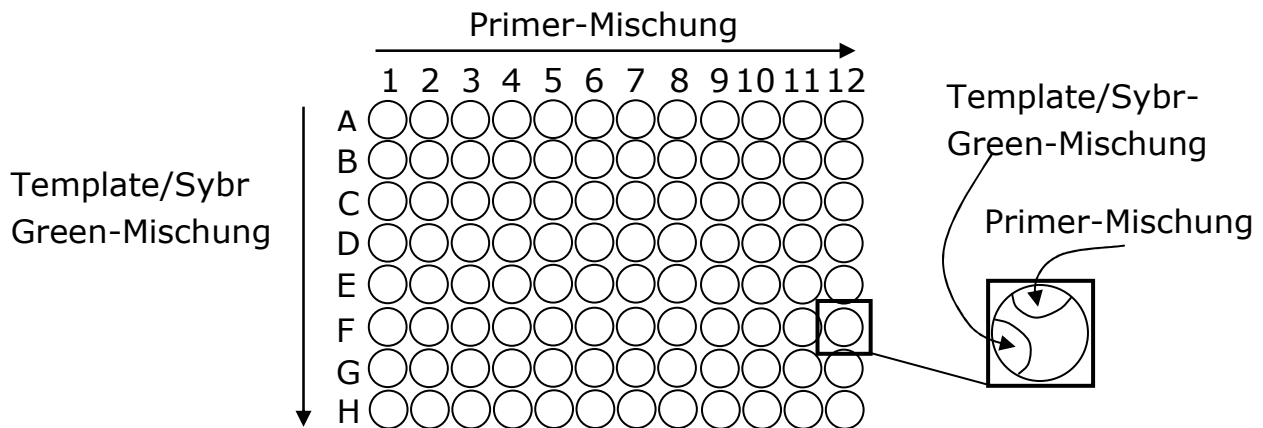


Abbildung 3.13: Pipettierschema für die *Real-time*-PCR: Die Primer-Mischung wird zuerst pro Reihe vorgelegt, dann wird die Platte um 90° gedreht und die Template/SybrGreen-Mischung pro Spalte dazu pipettiert. Das Pipettieren ist schematisch für Well F12 vergrößert dargestellt.

Die in Abbildung 3.13 dargestellte Reihenfolge des Pipettierens hat den Vorteil, dass man mit Hilfe der Schmelzpunktkurve der PCR-Produkte erkennen kann, wenn Wells durch falsche Primer-Mischungen während des Pipettierens kontaminiert wurden.

Nachdem alle Reagenzien in die Gefäße pipettiert worden waren, wurden die Gefäße verschlossen, die Reaktionsansätze in den Heizblock des Thermocyclers gestellt und die PCR in der Regel nach dem in Tabelle 3.4 dargestellten Protokoll durchgeführt.

Tabelle 3.4: allgemeines PCR-Protokoll (QuantiTect Qiagen).

Schritt		Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung		95 °C	15 min
30-40 Zyklen	Denaturierung	94 °C	20 sec
	Annealing	57 °C (primerabhängig)	20 sec
	Elongation	72 °C	30 sec
	Fluoreszenzmessung		
finale Elongation		50 °C	1 min

3.8.5 Housekeeping-Gene

ⓘ Die in letzter Zeit häufig als interne Standard-Gene, so genannte Housekeeping-Gene (HKG), eingesetzten Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und β -Actin (ACTB) zeigen bei vielen Versuchsdurchführungen eine signifikante Genregulierung.⁸¹ Sich auf ein einziges HKG zu beziehen, birgt das Risiko, dass eine Variabilität in der Genexpression unter den Versuchsbedingungen nicht erkannt wird und es daher zu falschen Rückschlüssen aufgrund der Ergebnisse kommt. Des Weiteren ist bei vielen Genen die biologische Funktion oftmals auch noch nicht vollständig geklärt, und man kann nicht vorhersagen, welche Auswirkung die experimentellen Bedingungen auf die Expression möglicher HKG haben. Es ist deshalb sicherer, sich auf eine mittlere Expression mehrerer HKGs, die nur eine geringe Varianz der Genexpression zeigen, zu beziehen. Daher ist es wichtig, dass jede Genexpressionsstudie damit beginnt, für den jeweiligen Versuchsaufbau geeignete Standard-Gene zu identifizieren, die durch die Versuchsdurchführung in ihrer Genexpression nicht deutlich beeinflusst werden.

Diese optimalen HKGs, die als interner Standard für vergleichende Genexpressionstudien dienen sollen, müssen für jede Versuchsbedingung individuell ermittelt werden. Durch den Einsatz von HKGs können Unterschiede in der Amplifikation der zu vergleichenden Proben aufgrund von

- unterschiedlichen Mengen an Ausgangsmaterial
- Qualitätsunterschieden der Proben
- Unterschieden in der RNA-Gewinnung und cDNA-Synthese

ausgeglichen werden, da das HKG den gleichen Bedingungen wie das zu untersuchende Gen, das so genannte „Gene of interest“ (GOI) ausgesetzt ist.

Als HKGs werden bevorzugt hoch exprimierte Gene ausgesucht, die eine fundamentale Rolle in der Zelle spielen. Vandesompele et al. haben eine Methode veröffentlicht, die auf der Annahme basiert, dass Gen-Paare, die zueinander relativ stabile Genexpressionsmuster aufweisen, als HKG eingesetzt werden können.⁸² Dieses Verfahren, welches geNorm zugrunde liegt, wird in 3.11.3 vorgestellt.

In dieser Arbeit wurden für die Housekeeping-Gen-Bestimmung folgende Gene (Primersequenzen und die Accession-Nummern siehe Kapitel 12.1) untersucht:

β-Actin (ACTB)

ACTB ist eines von zwei nicht-muskulären Aktinen und das Hauptprotein des Membranzytoskeletts von Eukaryonten. Es ist eines der klassischen Housekeeping-Gene, die traditionell als Standardgen eingesetzt werden.⁸³ Es findet in der RT-PCR vielfache Anwendung als alleiniges Kontrollgen^{84;85}, obwohl schon oft über den Stellenwert von ACTB als Kontrollgen diskutiert worden ist.^{86;87}

β-Microglobulin (B2M)

B2M gehört zum HLA-Komplex, der aus drei transmembranär verankerten α -Ketten ($\alpha 1$ - $\alpha 3$), an die extrazellulär die leichte β -Kette, das B2M, angelagert ist. Dieser Komplex wird von den meisten kernhaltigen Säugetierzellen exprimiert und kommt als Housekeeping-Gen in Frage, da B2M relativ stabil exprimiert wird.^{83;88-91}

β-Glucuronidase (GUSB)

GUSB ist eine lysosomale Säurehydrolase, die in ihrer aktiven Form an der Degradation von Glykosaminoglykanen beteiligt ist.⁹² GUSB ist ein häufig eingesetztes Housekeeping-Gen.^{83;93;94}

Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT1)

HPRT1 spielt eine entscheidende Rolle im Purin-Metabolismus, indem es Purine von degradierter DNA wiederverwertet. Insbesondere katalysiert HPRT1 die Reaktion zwischen Guanin bzw. Hypoxanthin und 5'-Phosphoribosyl-diphosphat zur Gewinnung von GMP bzw. IMP.⁹⁵ HPRT1 ist ebenso wie B2M ein relativ häufig verwandtes Housekeeping-Gen.^{83;90}

Ribosomales Protein, large, P0 (RPLP0)

RPLP0 ist ein ribosomales Protein der 60S-Untereinheit der Ribosomen und in diversen Genexpressionsstudien als Housekeeping-Gen beschrieben.^{83;91;93} In früheren Publikationen ist es auch unter dem Synonym HuPo zu finden.

Ribosomales Protein L13A (RPL13A)

RPL13A ist ein weiteres potentiell Housekeeping-Gen aus der Familie der ribosomalen Proteine. Wie RPLP0 gehört es der ribosomalen 60S-Untereinheit an. Es wird vielfach als potentieller interner Standard für die RT-PCR beschrieben.^{82;83;87}

Transferrin-Rezeptor (TFRC = TFR)

Transferrin ist das Transportprotein für Eisen, das zwei Bindungsstellen für dreiwertiges Eisen besitzt. Wenn Transferrin an seinen membranären Rezeptor, den Transferrin-Rezeptor, bindet, werden der Komplex internalisiert und die Zellen mit dem für viele Stoffwechselprozesse wichtigen Eisen versorgt. TFRC wird oft als potentiell Housekeeping-Gen untersucht.^{83;96}

Tyrosine 3-Monooxygenase/Tryptophan 5-Monooxygenase activation protein, zeta polypeptide (YWHAZ = PhosA2)

YWHAZ vermittelt Signaltransduktionen, indem es an Phosphoserin-haltige Proteine bindet. YWHAZ, früher auch PhosA2 genannt, wird ebenfalls vielfach in der RT-PCR als Housekeeping-Gen eingesetzt.^{82;83}

Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2D2 (UBE2D2 = UB)

Proteine werden durch eine Konjugation mit Ubiquitin markiert und der Proteolyse zugänglich gemacht. An der Ubiquitin-Markierung sind drei Klassen von Enzymen beteiligt:

- *Ubiquitin-aktivierende Enzyme*
- *Ubiquitin-konjugierende Enzyme*
- *Ubiquitin-Protein-Ligasen*

UBE2D2 gehört zur zweiten Klasse, den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen. In den hier durchgeführten Genexpressionsstudien wurde untersucht, ob UBE2D2 als Housekeeping-Gen in Frage kommt. Ein anderes Protein aus diesem Bereich ist Ubiquitin C (UBC), das oft in der Genexpressionsanalyse als Kontroll-Gen eingesetzt wird.⁸²

3.8.6 Relative Quantifizierung der RT-PCR

Eine Möglichkeit der relativen Auswertung der qRT-PCR ist die $2^{\Delta\Delta C_T}$ -Methode.⁹⁷ Dazu wird der C_T -Wert des GOI um den C_T -Wert des HKG korrigiert, indem sie voneinander subtrahiert werden (ergibt ΔC_T -Wert). Eine beispielhafte Berechnung ist in Tabelle 3.5 angegeben. Der ΔC_T -Wert zwischen HKG und GOI in einer Probe sagt aus, um wie viele Zyklen das GOI nach dem HKG den *threshold* übersteigt. Um zwei verschiedene Proben miteinander zu vergleichen, wird der $\Delta\Delta C_T$ -Wert aus der Differenz der beiden ΔC_T -Werte der jeweiligen Proben errechnet. Dieser ist, bezogen auf das HKG, die Differenz in der Zyklenzahl, bis das GOI in den beiden Proben den *threshold* übersteigt.

Tabelle 3.5: Beispielhafte Berechnung des Expressionsfaktors nach der $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode.

	$C_T \pm SD$ [unbehandelte Probe]	$C_T \pm SD$ [behandelte Probe]	$\Delta\Delta C_T$ -Wert
HKG	$26,60 \pm 0,38$	$26,70 \pm 0,02$	
GOI	$27,55 \pm 0,02$	$26,10 \pm 0,17$	
ΔC_T -Wert	$0,95 \pm 0,38$	$-0,60 \pm 0,17$	$1,55 \pm 0,42$

Bei der Differenzbildung wird der Fehler der Differenz berechnet nach Gleichung 3.5.

$$SD_{\Delta CT1-2} = \sqrt{(SD_{CT1})^2 + (SD_{CT2})^2}$$

Gleichung 3.5

Da sich die DNA-Menge pro Zyklus - bei der Annahme einer Effizienz von 100 % - verdoppelt, errechnet sich der Unterschied der Expression des GOI zwischen beiden Proben aus der Gleichung 3.6.

$$\text{Expressionsfaktor} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

Gleichung 3.6

Der Fehler des Expressionsfaktors ergibt sich nach Vandesompele aus Gleichung 3.7.⁸²

$$SD_{\text{Expressionsfaktor}} = SD_{\Delta\Delta CT} \times \ln 2 \times \text{Expressionsfaktor}$$

Gleichung 3.7

Damit ist das GOI um den Faktor $2,93 \pm 0,85$ in der behandelten Probe überexprimiert.

3.9 Suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH)

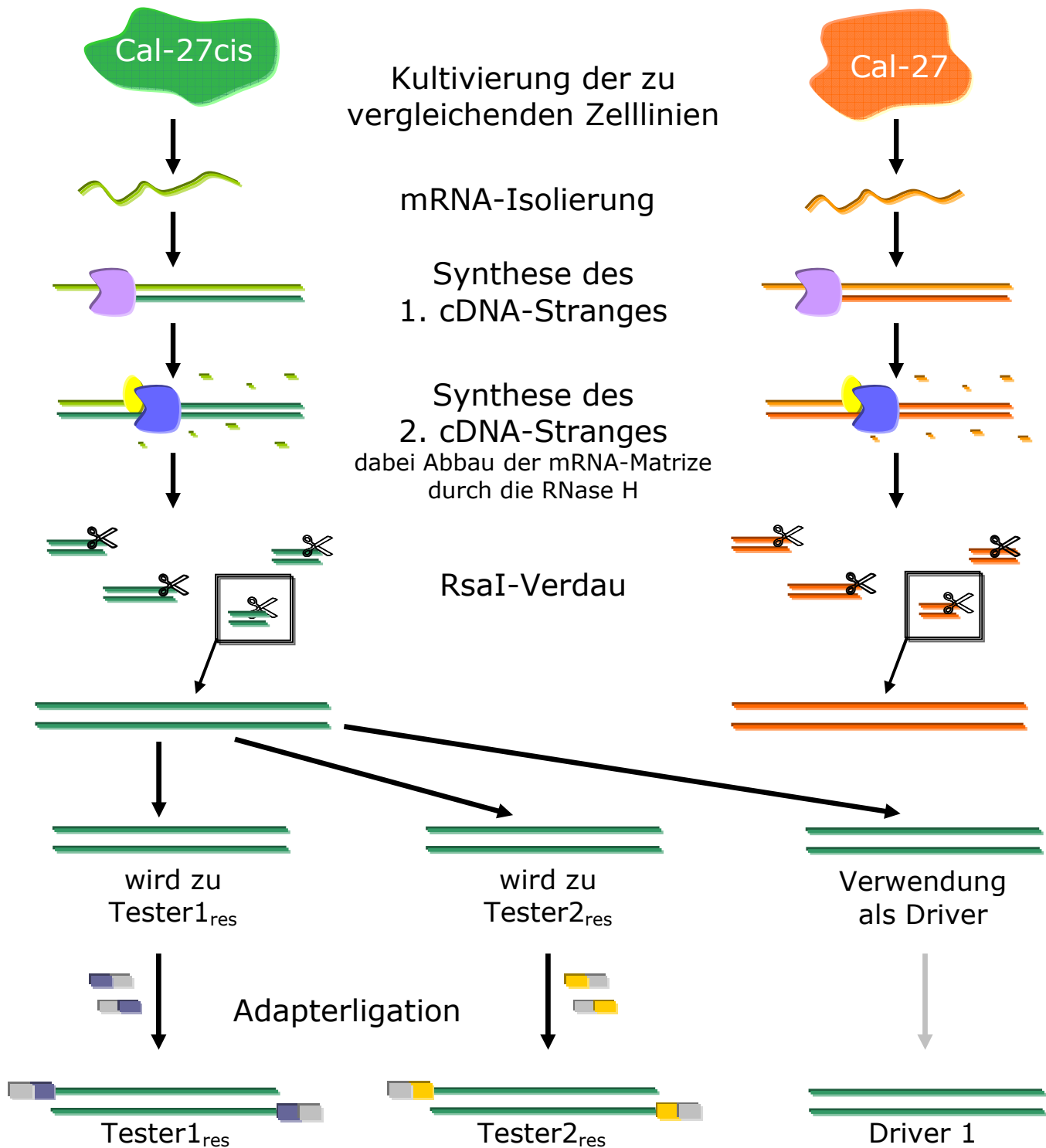


Abbildung 3.14: Schematischer Ablauf der Vorbereitung und der ersten Schritte der SSH.

 AMV Reverse Transkriptase
  DNA Polymerase I
  RNase H

 RsaI
  Adapter 1 (blau) und 2 (gelb)

3.9.1 Zellkulturbedingungen und mRNA-Isolierung für die SSH

Die beiden in ihrer Genexpression zu vergleichenden Zelllinien Cal27 und Cal27res wurden für 24 h mit 10 μ M Cisplatin behandelt, um therapeutische Plasmaspiegel zu simulieren.^{98;99} Nach einer Auswaschphase von 3 h in frischem Nährmedium ohne Cisplatin wurde, wie in 3.7.2 beschrieben, die RNA mit TRI[®]-Reagenz isoliert. Um die für die SSH benötigte mRNA aus der Gesamt-RNA zu isolieren, wurde wie in 3.7.2 beschrieben vorgegangen.

3.9.2 Allgemeines zur SSH

Die SSH wurde entsprechend des Herstellerprotokolls mit folgenden Ausnahmen durchgeführt:

- Die vorgeschlagene radioaktive Markierung der DNA mit [α -³²P]dCTP wurde nicht durchgeführt.
- Anstatt eines 5fachen Überschusses an Driver während der ersten Hybridisierung wurde nur ein 4facher Überschuss eingesetzt, um die Sensitivität der SSH zu erhöhen (mit dem Wissen, dass vermehrt falsch-positive Klone auftreten können, die sich der Neutralisation durch den Driver entziehen).
- Die Kontroll-SSH mittels Kontroll-Poly(A⁺)-RNA aus humanem Skelettmuskel (im SSH-Kit enthalten) wurde nicht durchgeführt.
- Die Kontrolle des cDNA-Verdaus wurde nicht, wie im Protokoll vorgeschlagen, auf Agarosegelen durchgeführt, sondern auf durch die Silberfärbung wesentlich empfindlicheren Polyacrylamidgelen.
- Die Kontrolle der Adapterligation wurde nicht, wie im Protokoll vorgeschlagen, auf Agarosegelen durchgeführt, sondern mit Hilfe des DNA-Farbstoffes Pico-Green.
- Alle Inkubationsschritte und PCR-Reaktionen der SSH wurden im Perkin Elmer *DNA Thermal Cycler 480* durchgeführt.

Materialien und Geräte

Perkin Elmer *DNA Thermal Cycler 480*, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
MicroAmp[®] Thin-Walled Reaction Tube, Applied Biosystems

0,5 ml-Reaktionsgefäße, steril

1,5-ml-Reaktionsgefäße, steril

Clontech PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit

AMV-Reverse-Transkriptase [20 U/μl]
cDNA-Synthese-Primer [10 μM]
5X *First Strand*-Puffer [250 mM Tris-HCl pH 8,5, 40 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 5 mM DTT]
20X *Second Strand Enzyme Cocktail* [6 U/μl DNA-Polymerase-I, 0,25 U/μl RNase H, 1,2 Units/μl E.coli-DNA-Ligase]
5X *Second Strand*-Puffer [500 mM KCl, 50 mM (NH₄)₂SO₄, 25 mM MgCl₂, 0,75 mM β-NAD, 100 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,25 mg/ml BSA]
T4-DNA-Polymerase [3 U/μl]
10X RsaI- Restriktionspuffer [100 mM Bis Tris Propan-HCl pH 7,0, 100 mM MgCl₂, 1 mM DTT]
RsaI [10 U/μl]
T4-DNA-Ligase [400 U/μl, 3 mM ATP]
5X DNA Ligationspuffer [250 mM Tris-HCl pH 7,8, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,25 mg/ml BSA]
Adapter 1 [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
Adapter 2R [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
4X Hybridisierungspuffer
Dilutionspuffer pH 8,3 [20 mM Hepes pH 6,6, 20 mM NaCl, 0,2 mM EDTA pH 8,0]
PCR-Primer 1 [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
Nested-PCR-Primer 1 [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
Nested-PCR-Primer 2R [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
G3PDH5'-Primer [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
G3PDH3'-Primer [10 μM], Sequenz siehe Anhang 12.1
dNTP-Mix [10 mM je dATP, dCTP, dGTP, dTTP]
20X EDTA/Glykogen-Mix [0,2 M EDTA, 1 mg/ml Glykogen]
NH₄OAc [4 M]
steriles Wasser

Advantage cDNA PCR Kit

50X Advantage-cDNA-Polymerase-Mix
[1,1 μg/μl KlenTaq-1-DNA-Polymerase und TaqStart-Antikörper, 50 % Glycerol, 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 25 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1 mM EDTA, 5 mM β-Mercaptoethanol, 0,25 % Thesit]
10X cDNA-PCR-Reaktionspuffer
[400 mM Trizin-KOH pH 9,2 bei 25 °C, 150 mM KOAc, 25 mM Mg(OAc)₂, 37,5 μg/ml BSA]

50X dNTP-Mix
[je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP]
CleanGel DNA-HP 15 %, Bestell-Nr. 1001-24, ETC Elektrophorese Technik,
Kirchentellinsfurt
15%iges Polyacrylamidgel
Anodenpuffer
Kathodenpuffer
Rehydrierungspuffer [Tris-Phosphat-Puffer]
CleanGel Long-10, Bestell-Nr. 1001-06, ETC
10%iges Polyacrylamidgel
Elektrodenpuffer [Tris-Borat-Puffer]
Rehydrierungspuffer
DNA-Long-Run-Puffer, Bestell-Nr. 1002-09, ETC
Delect-Puffer, pH 7,3, Bestell-Nr. 1002-08, ETC
Drying Cardboards, Bestell-Nr. 1003-18, ETC
Elektroden-Streifen, Bestell-Nr. 1003-06, ETC
 ϕ X-174-RF DNA, *Hae III* digest, Bestell-Nr. 27-4044-02, Amersham
Pharmacia Biotech Inc. [500 µg/ml]
100 bp DNA Ladder, Bestell-Nr. N3231L, Biolabs Inc., Vancouver, Canada
[500 µg/ml]
Chloroform
Isoamylalkohol
Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) (v/v)*
Ethanol absolut p. a.
Ethanol 95%ig*
Ethanol 80%ig*
Mineralöl
Petroleumbenzin
Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25:24:1) (v/v/v)
Fixierlösung für Silberfärbung
Silberlösung
Entwicklungslösung für Silberfärbung
Entwicklungsstopplösung
Imprägnierlösung
IKA-Schüttler MTS 2, Jahnke und Kunkel
Elektrophoresekammer Multiphor II, Pharmacia LKB, Freiburg
Microcomputer *Elektrophoresis Power Supply* E752, Renner GmbH,
Dannstadt
Färbewanne *Automated Gel Stainer* 80-6395-02, Amersham Pharmacia
Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA

* herzustellen aus den zuvor angegebenen Reagenzien

Um einen Überblick über diesen komplexen Versuch zu behalten, werden bei den im Folgenden einzeln dargestellten Schritten die jeweils benötigten Reagenzien noch einmal angegeben.

3.9.3 Synthese des ersten cDNA-Stranges

① *Ausgehend von der mRNA beider Proben werden diese in cDNA umgeschrieben. Dies geschieht in zwei Schritten, die in Abbildung 3.14 dargestellt sind: Zuerst wird der erste cDNA-Strang synthetisiert. Dann folgt die Synthese des zweiten cDNA-Stranges. Die eingesetzte Reverse Transkriptase synthetisiert den ersten cDNA-Strang anhand der mRNA-Matrize, so dass nach der Synthese des ersten cDNA-Stranges ein Hybrid-Doppelstrang aus RNA und DNA vorliegt.*

Materialien und Geräte

PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit

5X First Strand-Puffer

dNTP-Mix

AMV-Reverse-Transkriptase

cDNA-Synthese-Primer, Sequenz siehe Anhang 12.1

steriles Wasser

Eis

Thermocycler

Durchführung

Beide mRNA-Proben wurden parallel, wie folgt beschrieben, aufgearbeitet: 2,0 µg mRNA (resistent und sensitiv) wurden mit sterilem Wasser zu 4,0 µl ergänzt und mit 1,0 µl cDNA-Synthese-Primer versetzt. Da Oligopeptide und Enzyme erfahrungsgemäß nicht geschüttelt werden sollten, wurde der Ansatz abweichend vom Clontech-Protokoll mit der Pipette gut gemischt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Reaktionsansatz 2 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert und anschließend für 2 min auf Eis gekühlt. Zu jedem Gefäß wurden dann die in Tabelle 3.6 dargestellten Reagenzien gegeben.

Tabelle 3.6: Reagenzien für die Synthese des ersten cDNA-Stranges.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
5X <i>First Strand</i> -Puffer	2,0 µl	1X
dNTP-Mix	1,0 µl	1 mM je dNTP
steriles Wasser	1,0 µl	-
AMV-Reverse-Transkriptase	1,0 µl	2 U/µl

Die Gefäße wurden vorsichtig geschüttelt, kurz zentrifugiert und dann für 1,5 h bei 42 °C im Thermocycler inkubiert. Anschließend wurde das Kondenswasser herunterzentrifugiert. Danach wurden die Gefäße sofort auf Eis gesetzt, um die Synthese des ersten cDNA-Stranges zu beenden. Die Synthese des zweiten cDNA-Stranges wurde direkt im Anschluss durchgeführt.

3.9.4 Synthese des zweiten cDNA-Stranges

① *Drei verschiedene Enzyme werden während der Zweit-Strang-Synthese eingesetzt: Die RNase-H baut die mRNA ab, die DNA-Polymerase-I synthetisiert den zum ersten cDNA-Strang komplementären zweiten cDNA-Strang, und die DNA-Ligase verknüpft die neu entstehenden Bruchstücke des komplementären Stranges mit Hilfe des Cosubstrats β -NAD.*

Materialien und Geräte

PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit

5X *Second Strand*-Puffer

dNTP-Mix

20X *Second Strand Enzyme Cocktail*

steriles Wasser

20X EDTA/Glykogen-Mix

NH₄OAc

Ethanol 95%ig

Ethanol 80%ig

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (24:24:1) (v/v/v)

Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) (v/v)

Durchführung

Weiterhin wurden beide Probenansätze parallel, wie folgt beschrieben, aufgearbeitet: Zum Gefäß der ersten cDNA-Strang-Synthese, das bisher 10 µl enthielt, wurden die in Tabelle 3.7 dargestellten Reagenzien hinzugegeben.

Tabelle 3.7: Reagenzien für die Synthese des zweiten cDNA-Strangs.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
steriles Wasser	48,4 µl	-
5X <i>Second Strand</i> -Puffer	16,0 µl	1X
dNTP-Mix	1,6 µl	je 200 nM
20X <i>Second Strand Enzyme Cocktail</i>	4,0 µl	1X

Der Inhalt des Gefäßes wurde vorsichtig mit der Pipette gemischt und kurz zentrifugiert. Das Endvolumen betrug nun 80 µl und der Ansatz wurde für 2 h bei 16 °C im Thermocycler inkubiert. Nach Zusatz von 6 U T4-DNA-Polymerase (finale Konzentration 0,07 U/µl) wurde die Probe gut mit der Pipette gemischt und für weitere 30 min bei 16 °C im Thermocycler inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurden 4 µl 20X EDTA/Glykogen-Mix hinzugegeben und der Ansatz gemischt.

Um die entstandene cDNA zu extrahieren, wurden 100 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol hinzugegeben, die Probe gründlich geschüttelt und anschließend 10 min bei RT und 14 000 rpm zentrifugiert. Vorsichtig wurde die obere wässrige Phase in ein steriles, neues Gefäß überführt, ohne die mittlere oder untere Phasengrenze zu beschädigen. Zur wässrigen Phase wurden erneut 100 µl Chloroform : Isoamylalkohol gegeben, wiederum geschüttelt und wie oben angegeben zentrifugiert, bevor die obere wässrige Phase in ein steriles, neues Gefäß überführt wurde.

Um dann die cDNA zu fällen, wurden 40 µl 4 M NH₄OAc und 300 µl 95%iger Ethanol hinzugegeben, das Gefäß gründlich geschüttelt und bei 14 000 rpm bei RT für 20 min zentrifugiert. Der Überstand über dem kaum sichtbaren Pellet wurde mit 200- bzw. 10-µl-Pipetten vorsichtig so weit wie möglich abgenommen. Da kein [α-³²P]dCTP eingesetzt wurde, konnte das Pellet nur optisch kontrolliert werden.

Um das Pellet zu waschen, wurde es dann mit 500 µl 80%igem Ethanol überschichtet, kurz geschüttelt und anschließend laut Protokoll erneut bei 14 000 rpm und bei RT für 10 min zentrifugiert, damit sich das Pellet wieder absetzen konnte. Wiederum wurden der Überstand vorsichtig mit Pipettenspitzen entfernt und das Pellet etwa 10 min an der Luft getrocknet. Sobald der restliche Ethanol verdunstet war, wurde das Pellet farblos und konnte in 50 µl sterilem H₂O aufgenommen werden. Um später diese noch unverdaute mit der verdauten cDNA zu vergleichen, wurden 6 µl der Probe in ein neues steriles Gefäß überführt. Alle Gefäße wurden bei -20 °C über Nacht eingefroren.

3.9.5 Verdau der cDNA

① *RsaI* ist eine Restriktionsendonuklease, die mittig ihrer Erkennungssequenz GTAC den DNA-Doppelstrang in kleinere Moleküle mit stumpfen Enden schneidet. Dieser Verdau wird mit den beiden cDNA-Proben (resistent und sensitiv) durchgeführt (siehe Abbildung 3.15). Auch der cDNA-Synthese-Primer, der für die Synthese des ersten cDNA-Stranges eingesetzt worden ist, hat eine *RsaI*-Erkennungssequenz, so dass auch endständige Fragmente eines Doppelstranges mit stumpfen Enden aus dem Verdau herausgehen. Dies ist wichtig, damit diese Moleküle effektiv während der folgenden Adapterligation mit Adaptern ligiert werden können.



Abbildung 3.15: RsaI-Verdau: Sowohl die resistente als auch die sensitive cDNA-Probe wird mittels RsaI in kleinere Fragmente mit stumpfen Enden geschnitten.

Materialien und Geräte

PCR-select™ cDNA Subtraction Kit

RsaI

10X RsaI-Restriktionspuffer

EDTA/Glykogen-Mix

NH₄OAc

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (24:24:1) (v/v/v)

Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) (v/v)

φX-174-RF DNA *Hae III* digest

100 bp DNA Ladder

Durchführung

Beide erhaltenen ds-cDNA-Proben wurden wie folgt parallel aufgearbeitet: In einem Gefäß wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Reagenzien zusammen pipettiert und durch kurzes Schütteln gemischt.

Tabelle 3.8: Reagenzien für den Verdau der cDNA.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
ds-cDNA aus 3.9.4	43,5 µl	-
10X RsaI-Restriktionspuffer	16,0 µl	1X
RsaI	1,5 µl	0,25 U/µl

Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Ansätze bei 37 °C für 90 min inkubiert. Um die Effizienz dieses cDNA-Verdaues zu überprüfen, wurden dann vor dem weiteren Vorgehen 5 µl der verdauten Ansätze zurückbehalten und später mit der unverdauten cDNA (siehe Kapitel 3.9.6) verglichen. Zum Stoppen der Reaktion wurden zum übrigen Reaktionsansatz 2,5 µl 20X EDTA/Glykogen-Mix zugegeben.

Um die nun verdaute cDNA aufzureinigen und zu konzentrieren, wurde dem Reaktionsansatz 50 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (24:24:1) zugesetzt und gründlich geschüttelt. Das Gefäß wurde bei 14 000 rpm und RT über 10 min zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Der wässrige Überstand wurde in ein sauberes 0,5-ml-Gefäß überführt. Dann wurden 50 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24:1) (v/v) zugegeben und gründlich

geschüttelt. Das Gefäß wurde erneut bei 14 000 rpm und RT für 10 min zur Phasentrennung zentrifugiert. Wieder wurde der wässrige Überstand in ein sauberes 0,5-ml-Gefäß überführt. Aus diesem Überstand wurde die verdaute ds-cDNA durch Zugabe von 25 µl 4 M NH₄OAc und 187,5 µl 95%igem Ethanol (v/v) gefällt. Dazu wurde der Ansatz gründlich geschüttelt und das Gefäß bei 14 000 rpm und RT für 20 min zentrifugiert. Der Überstand über dem gebildeten Pellet wurde mit 200- und 10-µl-Pipettenspitzen soweit wie möglich abgenommen. Das Pellet wurde zum Waschen vorsichtig mit 200 µl 80%igem Ethanol überschichtet und geschüttelt. Um das Pellet wieder am Boden des Gefäßes zu sammeln, wurde das Gefäß bei 14 000 rpm und RT 5 min zentrifugiert. Wie zuvor beschrieben, wurde der Überstand erneut abpipettiert, und mit Hilfe von Pipettenspitzen wurden restliche Flüssigkeitstropfen durch die Kapillarkräfte aufgenommen. Das Pellet wurde 5 bis 10 min an der Luft getrocknet, bevor das nun farblose Pellet in 5,5 µl sterilem H₂O aufgenommen wurde. Die so enthaltene verdaute cDNA fungierte als Driver-cDNA. Um aus einem Teil davon die Tester-cDNA zu synthetisieren, wurde später ein Teil dieser verdauten cDNA mit Adaptern ligiert.

3.9.6 Kontrolle des RsaI-Verdaus

① *Der RsaI-Verdau wird kontrolliert, indem man jeweils die verdaute neben der unverdauten cDNA einer Probe auf einem Polyacrylamidgel auftrennt. Polyacrylamidgele mit Silberfärbung sind wesentlich empfindlicher als mit Interkalantien angefärbte Agarosegele. Erfahrungsgemäß lassen Agarosegele an dieser Stelle des Protokolls keine deutliche Aussage zu, ob der cDNA-Verdau in ausreichendem Maße stattgefunden hat. Deswegen wird an dieser Stelle abweichend vom Clontech-Protokoll ein Polyacrylamidgel verwendet. Unverdaute cDNA-Proben erscheinen im höhermolekularen Bereich intensiver auf dem Gel als die entsprechend verdauten cDNA-Proben.*

Materialien und Geräte

CleanGel DNA-HP 15 %

Rehydratisierungspuffer

Anodenpuffer

Kathodenpuffer

Delect-Puffer

ϕ X-174-RF DNA, *Hae III* digest
100 bp DNA Ladder
Petroleumbenzin
CleanPool
Drying Cardboards
IKA-Schüttler MTS 2
Elektrophoresekammer Multiphor II
Microcomputer *Electrophoresis Power Supply* E752
Färbewanne *Automated Gel Stainer*
Fixierlösung für Silberfärbung
Silberlösung
Entwicklungslösung für Silberfärbung
Entwicklungsstopplösung
Imprägnierlösung
Reinstwasser

Durchführung der Gelelektrophorese

Abweichend vom Clontech-Protokoll wurde der cDNA-Verdau auf einem Polyacrylamidgel geprüft, denn die Empfindlichkeit eines Polyacrylamidgels mit Silberfärbung ist deutlich höher als die von Agarosegelen.

Das Polyacrylamidgel wurde in dem entsprechenden Rehydratisierungspuffer 1,5 h quellen gelassen. Dazu wurde der Puffer in den *CleanPool* (entsprechende Wanne, passend für die Polyacrylamidgele) gegeben und das Gel mit der Polyacrylamid-Seite nach unten blasenfrei mit Hilfe einer Pipette darauf gelegt. Damit das Gel gleichmäßig quellen konnte, wurde der *CleanPool* langsam auf dem Schüttler hin und her bewegt.

Sobald das Gel gequollen war, wurde es vorsichtig mit Filterpapier, den so genannten *Drying Cardboards*, abgetrocknet. Auf die Kühlplatte der Kammer wurden 2 ml Petroleumbenzin gegeben, damit die Kälte besser auf das Gel übertragen werden konnte. Das Gel wurde langsam blasenfrei darauf gelegt und das überschüssige Petroleumbenzin an den Rändern des Gels mit *Drying Cardboards* aufgenommen.

Je drei Lagen der Elektroden-Streifen wurden mit den entsprechenden Elektrodenpuffern getränkt, auf dem Gel platziert und die Elektroden angeschlossen. Vor dem Beladen des Gels wurden die Marker wie folgt verdünnt:

0,5 µl λ DNA *Hind III Digest*
 bzw. 0,5 µl 100 bp DNA Ladder
 ad 6,5 µl steriles H₂O

Nebeneinander wurden in die maximal 7 µl fassenden Geltaschen eines 15%igen Polyacrylamidgels *CleanGel* DNA-HP aufgetragen:

6,5 µl λ DNA - *Hind III Digest* (38,5 µg/ml), verdünnt (s. o.)
 6,5 µl 100 bp Ladder (38,5 µg/ml), verdünnt (s. o.)
 2,5 µl resistent - cDNA unverdaut
 5,0 µl resistent - cDNA verdaut
 2,5 µl sensitiv - cDNA unverdaut
 5,0 µl sensitiv - cDNA verdaut

Die Gelelektrophorese wurde unter den in Tabelle 3.9 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3.9: Bedingungen für die Elektrophorese des Polyacrylamidgels *CleanGel* DNA-HP 15 % für die Kontrolle des *RsaI*-Verdaus.

max. Spannung [V]	max. Stromstärke [mA]	max. Leistung [W]	Zeit [min]
250	22	10	20
425	30	26	50
525	30	26	20
			Σ 90

Durchführung der Silberfärbung

Um die Qualität der verwendeten Silber- und Entwicklungslösung (enthält Natriumcarbonat) zu überprüfen, wurden gleiche Volumina beider Lösungen in einem Reaktionsgefäß miteinander gemischt. Es musste ein schwarzer Niederschlag elementaren Silbers ausfallen.

Die Silberfärbung wurde in der Färbewanne durchgeführt. Dazu mussten die benötigten Lösungen vorbereitet und in die jeweiligen Vorratsbehälter gefüllt werden. Dies waren:

- Fixierlösung
- Reinstwasser
- Silberlösung

- Entwicklungslösung
- Entwicklungsstopplösung
- Imprägnierlösung

Das Gel wurde in die Färbewanne gelegt und mit den dazugehörigen kleinen Magneten fixiert. Die Färbewanne wurde dann, wie in Tabelle 3.10 angegeben, programmiert und hat die Silberfärbung des Gels durchgeführt.

Tabelle 3.10: Ablauf der Silberfärbung.

Schritt	Lösung	Volumen [ml]	Zeit [min]
Fixieren	Fixierlösung	250	45
1. Waschen	Reinstwasser	250	15
2. Waschen	Reinstwasser	250	15
3. Waschen	Reinstwasser	250	15
Färben	Silberfärbelösung	200	45
Waschen	Reinstwasser	100	0,5
Entwickeln	Entwicklungslösung	200	5
Stopp des Entwickelns	Entwicklungsstopp- lösung	250	20
Imprägnieren	Imprägnierlösung	200	30
Waschen	Reinstwasser	100	1

Das angefärbte Gel wurde an der Luft getrocknet. Nach dieser Silberfärbung des Gels wurde jeweils die gleiche Probe vor und nach dem Verdau miteinander verglichen. Aus Poly(A⁺)-mRNA gewonnene cDNA erscheint als ein „Schmier“ auf dem Gel zwischen 0,5 – 10 kb. Nach dem RsaI-Verdau war die durchschnittliche cDNA-Länge kleiner (0,1 – 2 kb).

3.9.7 Adapterligation

① Dieser Schritt wurde nur mit der Tester- und nicht mit der Driver-cDNA durchgeführt. Im Prinzip wird jede RsaI-verdaute Probe in drei Teile aufgeteilt. Der größte Teil wird später als so genannter Driver eingesetzt. Die beiden kleineren Teile einer Probe werden je entweder mit Adapter 1 oder Adapter 2 ligiert. So entstehen aus der resistenten Probe die Tester1_{res} und Tester2_{res} und aus der sensitiven Probe die Tester1_{sens} und Tester2_{sens}. Abbildung 3.16 zeigt dies am Beispiel der resistenten Probe, Produkte der sensitiven Probe sind ebenfalls dargestellt.

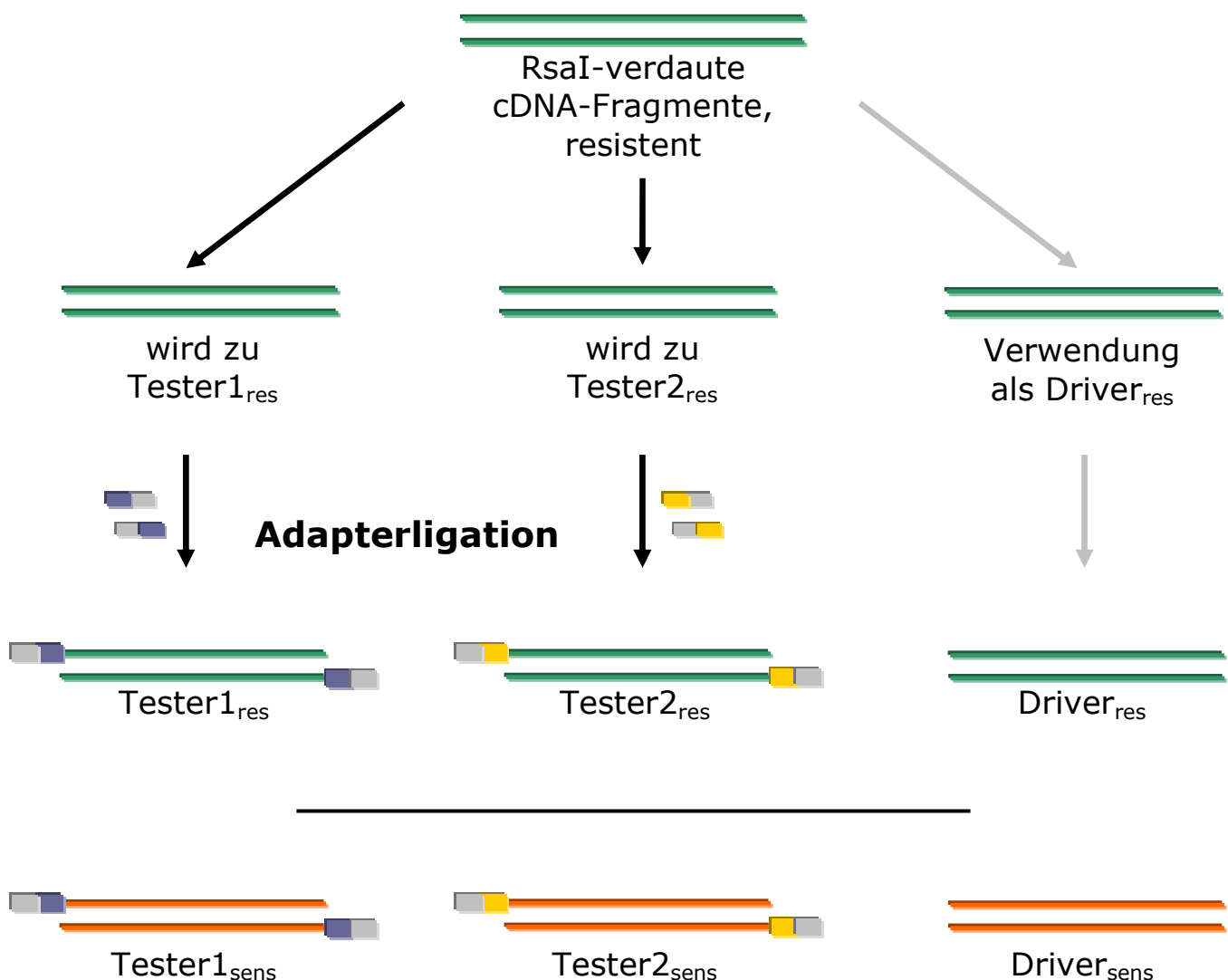


Abbildung 3.16: Schematischer Ablauf der Adapterligation, dargestellt am Beispiel der resistenten Fragmente; gleiches geschieht mit den Fragmenten der sensitiven Probe, deren Produkte unten abgebildet sind.

Durchführung

Um die Adapter-ligierte Tester-cDNA zu erzeugen, wurde 1,0 µl der RsaI-verdauten cDNA aus 3.9.5 mit 5,0 µl Wasser verdünnt (im Folgenden „verdünnte Tester-cDNA“ genannt). Dann wurde der in Tabelle 3.11 angegebene Ligations-Mastermix in einem 0,5-ml-Gefäß hergestellt (vier Ansätze plus ein Ansatz Schwundüberschuss).

Tabelle 3.11: Mastermix für die Adapterligation.

Reagenz	Volumen pro Ansatz	Volumen 5 Ansätze
steriles Wasser	2,5 µl	12,5 µl
5X Ligationspuffer	2,0 µl	10,0 µl
T4-DNA-Ligase (400 U/µl)	1,0 µl	5,0 µl

2,0 µl der verdünnten Tester-cDNA wurden nach dem in Tabelle 3.12 angegebenen Schema mit den verschiedenen Adaptern versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt.

Tabelle 3.12: Pipettierschema für die Adapterligation, durchgeführt mit Tester1_{sens}, Tester2_{sens}, Tester1_{res} und Tester2_{res}.

Reagenz	Tester1 _{sens/res}	Tester2 _{sens/res}
verdünnte Tester-cDNA	2,5 µl	2,5 µl
Adapter 1 [10 µM]	2,0 µl	-
Adapter 2R [10 µM]	-	2,0 µl
Master Mix	5,5 µl	5,5 µl
Endvolumen	10,0 µl	10,0 µl

Die Proben wurden kurz zentrifugiert und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Dann wurde die Ligation durch Zugabe von 1,0 µl EDTA/Glykogen-Mix und 5-minütiges Erhitzen auf 72 °C gestoppt und anschließend herunterzentrifugiert. Die Ligation der Adapter war nun erfolgt. 1,0 µl jeder ligierten cDNA wurde mit 1,0 ml H₂O verdünnt. Diese Proben wurden als Kontrolle für die PCR-Amplifikation benötigt (siehe Kapitel 3.9.8). Entgegen dem

Clontech-Protokoll wurden die Proben nicht bei -20 °C gelagert, sondern es wurde sofort mit der ersten Hybridisierung fortgefahren.

3.9.8 Kontrolle der Adapterligation

① Die Kontrolle der Effizienz der Adapterligation gehört vom Ablauf an diese Stelle des Protokolls. Clontech weist ausdrücklich darauf hin, dass die Adapterligationskontrolle unbedingt vor dem Fortfahren mit der in Kapitel 3.9.9 beschriebenen ersten Hybridisierung erfolgen soll. Aus Zeitgründen kann diese Ligationskontrolle aber ohne weiteres nach dem Ansatz der ersten Hybridisierung erfolgen, da diese über acht Stunden inkubiert wird.

Die Kontrolle der Adapterligation ist nötig, um sicher zu stellen, dass ausreichend ds-cDNA-Stränge Adapter an beiden Enden tragen. Bei der Adapterligationskontrolle werden je Tester zwei PCR-Ansätze mit unterschiedlichen Primern amplifiziert, zum einen mit G3PDH-Primern und zum anderen mit dem PCR-Primer 1. Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (G3PDH) ist ein ubiquitär vorkommendes Housekeeping-Gen. Der PCR-Primer 1 ist identisch mit dem äußeren Teil beider Adapter. Während des ersten PCR-Zyklus' hat der PCR-Primer 1 noch keine Bindestelle. Erst nachdem der G3PDH5'-Primer einen ersten komplementären Strang mit einer zum Adapter komplementären Sequenz synthetisiert hat, kann dort im nächsten Zyklus der PCR-Primer 1 binden. So entsteht bei der Kombination von G3PDH5'-Primer und PCR-Primer 1 ein etwa 750 Bp langes PCR-Produkt (a). Werden jedoch beide G3PDH-Primer kombiniert, entsteht ein 450 Bp langes PCR-Produkt (b). Dies ist in Abbildung 3.17 dargestellt.

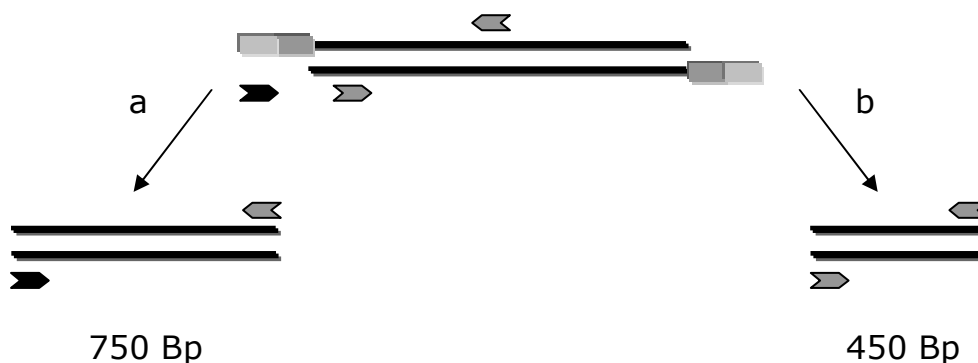


Abbildung 3.17: PCR-Produkte der Kontrolle der Adapterligation bei Kombination von G3PDH3'- und PCR-Primer 1 (a) bzw. der beiden G3PDH-Primer (b).

➤ G3PDH5'-Primer ◀ G3PDH3'-Primer ➤ PCR-Primer 1

Materialien und Geräte

Advantage cDNA PCR Kit

10X PCR-Reaktionspuffer

50X dNTP-Mix

50X Advantage-cDNA-Polymerase-Mix

Clontech PCR-select™ cDNA Subtraction Kit

steriles Wasser

G3PDH3'-Primer

G3PDH5'-Primer

PCR-Primer 1

PicoGreen® dsDNA Quantitation Kit

1X TE-Puffer [10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5] (1:20 aus 20X TE-Puffer verdünnt)

PicoGreen-Stammlösung [in DMSO gelöst, keine Konzentrationsangabe]

POLARstar Galaxy, bmg Labtech GmbH

Durchführung

Beschrieben wird die Ligationskontrolle nur für eine Richtung. Der gleiche Ansatz wurde ebenfalls mit Tester1_{sens} und Tester2_{sens} durchgeführt: 1,0 µl jeder ligierten cDNA wurde in 200 µl H₂O verdünnt. Die in Tabelle 3.13 angegebenen Reagenzien wurden in vier Gefäßen gemischt. Für jede geplante Reaktion wurde dann ein PCR-Mastermix aus den in Tabelle 3.14 angegebenen Reagenzien mit einem Ansatz im Überschuss gemischt. Dieser Mastermix wurde durch Schütteln gemischt und kurz zentrifugiert. In jedes Gefäß, das in Tabelle 3.13 angegeben ist, und die entsprechend angesetzten Gefäße für Tester1_{sens} und Tester2_{sens} wurden 22,0 µl des Mastermixes aliquotiert.

Tabelle 3.13: Pipettierschema für die Adapterligationskontrolle.

Reagenz		Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3	Gefäß 4
Tester1 _{res}	[µl]	1	1	-	-
Tester2 _{res}	[µl]	-	-	1	1
G3PDH3'-Primer	[µl]	1	1	1	1
G3PDH5'-Primer	[µl]	-	1	-	1
PCR-Primer 1	[µl]	1	-	1	-
Endvolumen	[µl]	3	3	3	3

Tabelle 3.14: PCR-Mastermix für die Kontrolle der Adapterligation.

Reagenz	Volumen pro Ansatz [μ l]	Gesamtvolumen 9 Ansätze [μ l]*
steriles H ₂ O	18,5	166,5
10X PCR-Reaktionspuffer	2,5	22,5
50X dNTP-Mix	0,5	4,5
50X Advantage-cDNA-Polymerase Mix	0,5	4,5

*** Neun Ansätze sind bereits berechnet für die hier nicht beschriebenen Tester-cDNAs der zweiten SSH-Richtung, pro Richtung sind es vier Ansätze (s. Tabelle 3.13) plus ein Ansatz Schwundüberschuss.**

Die Reaktionsansätze wurden durch Schütteln gemischt und kurz zentrifugiert. Jeder PCR-Ansatz wurde mit 50 μ l Mineralöl überschichtet, bevor die Reaktionsansätze im Thermocycler bei 75 °C für 5 min inkubiert wurden. Dieser Schritt füllte die nicht mit Adaptern ligierten Stränge auf, um den PCR-Primern Bindungsstellen zu bieten. Ohne die Gefäße aus dem Thermocycler zu nehmen, wurde eine PCR angeschlossen, deren Bedingungen in Tabelle 3.15 zusammengefasst sind.

Tabelle 3.15: PCR-Bedingungen für die Adapterligationskontrolle.

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [min]	Zyklen
Denaturierung	94	0,5	} 30
Annealing	65	0,5	
Elongation	68	2,5	

Als Blank für die Adapterligationskontrolle wurden die PCR-Reaktionsansätze (siehe Tabelle 3.13 und 3.14) erneut zusammenpipettiert, um die Fluoreszenz der Primer und eingesetzten Template-Menge zu bestimmen. Anschließend wurden sowohl die erhaltenen PCR-Produkte, die Blank-PCR-Proben als auch die PicoGreen-Stammlösung 1:200 mit 1X TE-Puffer pH 7,5 verdünnt. 100 μ l jeder verdünnten Probe wurden mit 100 μ l der verdünnten PicoGreen-Lösung versetzt. Alle Proben wurden 5 min lichtgeschützt bei RT inkubiert, bevor die Fluoreszenz im Mikroplattenleser vermessen wurde. Die Excitation erfolgte bei $\lambda = 485$ nm, die Emmission wurde bei $\lambda = 520$ nm gemessen. Nachdem die Fluoreszenzwerte der

Proben um den Blank korrigiert worden waren, wurde die Fluoreszenz der Proben 2 bzw. 4 (Tabelle 3.13) jeweils gleich 100 % gesetzt. Probe 1 sollte bezogen auf Probe 2 mindestens 25 % Fluoreszenz zeigen, ebenso wie Probe 3 bezogen auf Probe 4. Damit wurde sichergestellt, dass mindestens 25 % der Tester mit Adaptern ligiert worden waren.

3.9.9 Erste Hybridisierung

① Für die Durchführung der ersten Hybridisierung wird zu jedem Tester ein Überschuss an Driver der anderen Probe hinzugefügt. Die Proben werden unter Erhitzen denaturiert und die Hybridisierung von Tester und Driver wird ermöglicht. cDNA-Sequenzen, die sowohl im Driver als auch im Tester vorkommen, lagern sich zu Hybriden zusammen. Übrigbleibende ss-cDNAs des Testers, die keine Komplementärsequenzen im Driver finden, werden relativ angereichert. Dabei sind verschiedene Einzel- und Doppelstränge möglich, die in Abbildung 3.18 dargestellt sind.

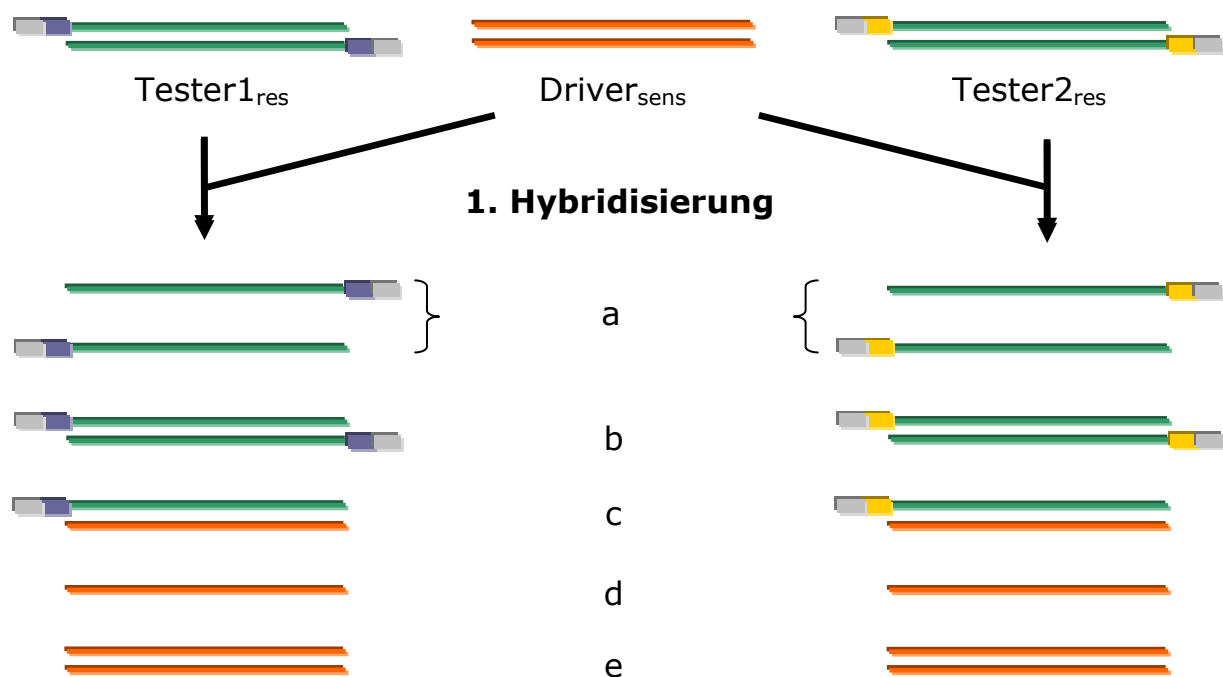


Abbildung 3.18: Mögliche Hybride der 1. Hybridisierung zwischen Tester und Driver; dargestellt ist jeweils die Hybridisierung von Tester1_{res} bzw. Tester2_{res} mit Driver_{sens}. Ebenso wurden die Tester1_{sens} bzw. Tester2_{sens} mit Driver_{res} hybridisiert.

Zu Abbildung 3.18: (a) Meist sind dies differentiell exprimierte Sequenzen, die ihren komplementären Tester-Einzelstrang aufgrund des Konzentrationsunterschiedes zwischen Driver und Tester nicht finden und nicht durch den Driver-Überschuss neutralisiert werden können, da sie in der Tester-Fraktion aufgrund ihrer Überexpression im Überschuss vorliegen. In (b) liegen komplementäre Tester-Stränge vor, die miteinander hybridisiert sind. (c) Der Großteil der Tester-Einzelstränge hybridisiert mit einem komplementären Driver-Einzelstrang und bildet die dargestellten Heterodimere aus. Nach der Hybridisierung liegen einige Driver-Fragmente weiterhin als Einzelstränge (d), die Mehrzahl jedoch als Doppelstränge (e).

Materialien und Geräte

PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit

4X Hybridisierungspuffer

steriles Wasser

Driver-cDNAs

Tester-cDNAs

Mineralöl

Durchführung

Vor Beginn der Hybridisierung wurde sichergestellt, dass der 4X Hybridisierungspuffer für 15 bis 20 min bei RT aufbewahrt wurde und diese Temperatur erreicht hatte. Es durften keine sichtbaren Partikel ausgefallener Salze mehr vorhanden sein. Wenn nötig, wurde der Puffer etwa 10 min auf 37 °C erhitzt, um mögliche Präzipitate zu lösen. Für die erste Hybridisierung eines jeden Testers mit entsprechendem Driver wurden vier Reagenzien in der in Tabelle 3.16 angegebenen Reihenfolge in 0,5-ml-Gefäßen gemischt, so dass jeder der vier Ansätze 4 µl enthielt. Hierbei wurde abweichend von dem Clontech-Protokoll nur ein 4facher Driver-Überschuss eingesetzt.

Tabelle 3.16: Pipettierschema für die erste Hybridisierung.

Reagenz		Probe 1	Probe 2
RsaI-verdaute Driver-cDNA*	[µl]	1,5	1,5
Adapter 1-ligierter Tester1	[µl]	1,5	-
Adapter 2R-ligierter Tester2	[µl]	-	1,5
4X Hybridisierungspuffer	[µl]	1,0	1,0

*** Änderungen des Clontech-Protokolls zur Reduktion des Driver-Überschusses.**

Nach dem Überschichten der Proben mit je einem Tropfen Mineralöl wurden diese vorsichtig zentrifugiert. Zur Denaturierung wurden die Proben dann im Thermocycler bei 98 °C über 1,5 min inkubiert und anschließend für die erste Hybridisierung weitere 8 h (über Nacht) bei 68 °C.

3.9.10 Zweite Hybridisierung

① Die beiden Tester einer Richtung der ersten Hybridisierung unterscheiden sich nur in der Art der Adapter. Sie stammen ursprünglich aus der gleichen cDNA-Population und wurden mit demselben Driver hybridisiert. Im folgenden Schritt werden sie zusammengemischt und gleichzeitig frisch denaturierte Driver-cDNA hinzugegeben (Abbildung 3.19). Neue Hybridmoleküle (f) können entstehen, die aus den differentiell exprimierten Sequenzen mit unterschiedlichen Adaptern an jedem Ende bestehen.

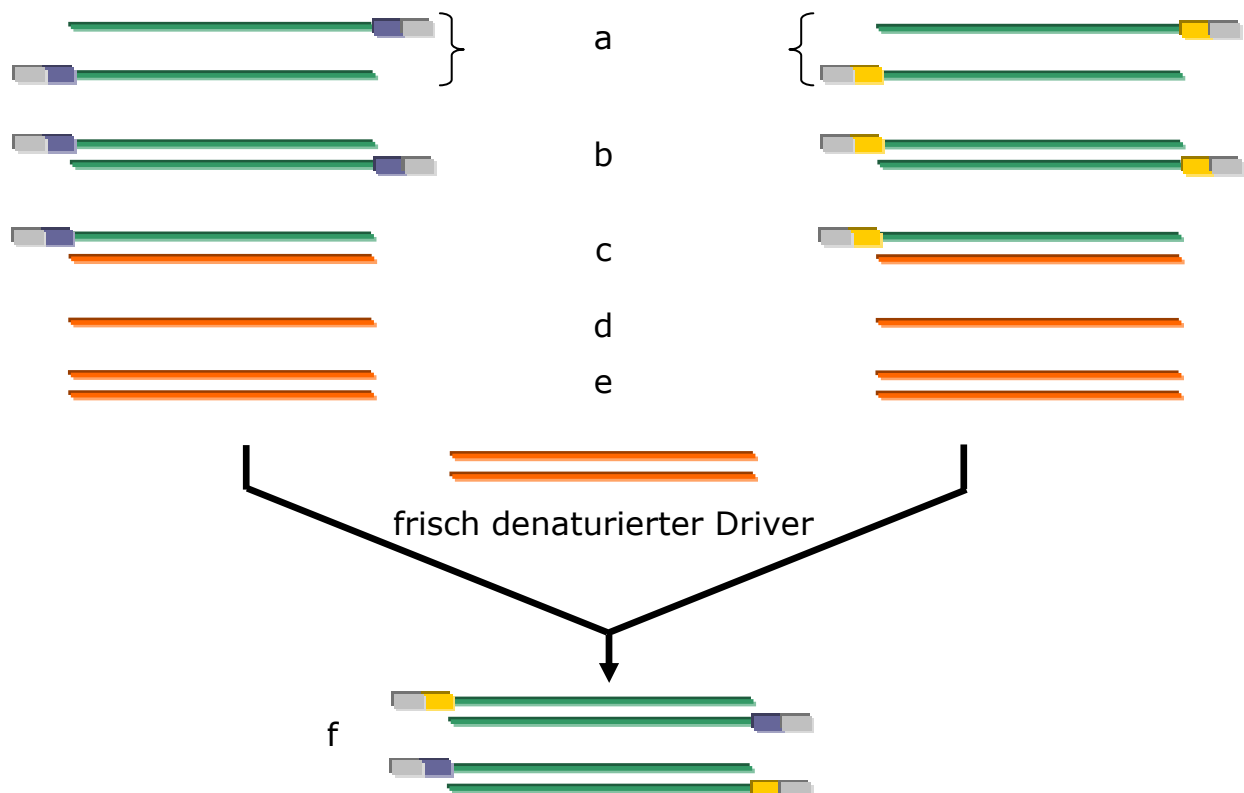


Abbildung 3.19: Zweite Hybridisierung zwischen den beiden Driver-neutralisierten Testern, bei der eine neue Art Hybrid entsteht (f), das zwei unterschiedliche Adapter an beiden Enden trägt.

Materialien und Geräte

PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit

4X Hybridisierungspuffer

steriles Wasser

Dilutionspuffer

Mineralöl

Durchführung

Wichtig war, dass die Proben der ersten Hybridisierung an dieser Stelle nicht wieder denaturiert wurden. Ebenso sollten die Proben nicht länger als nötig aus dem Thermocycler genommen werden.

Tabelle 3.17: Reaktionsansatz für die Denaturierung von frischem Driver für die zweite Hybridisierung.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
Driver-cDNA	1,0 µl	-
4X Hybridisierungspuffer	1,0 µl	1X
steriles Wasser	2,0 µl	-

Um frischen Driver zu denaturieren, wurden die in Tabelle 3.17 angegebenen Reagenzien gemischt. In zwei 0,5-ml-Gefäße wurde je 1,0 µl dieser Mischung überführt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und für die Denaturierung für 1,5 min bei 98 °C im Thermocycler inkubiert.

Das Gefäß mit frisch denaturiertem Driver wurde aus dem Thermocycler genommen. Die folgende Arbeitsanweisung (siehe auch Abbildung 3.20) zum gleichzeitigen Mischen des Drivers mit Tester1 und Tester2 der ersten Hybridisierung stellte sicher, dass die Proben nur in Gegenwart von frisch denaturiertem Driver gemischt wurden. Diese Schritte wurden für jede experimentelle Tester-cDNA durchgeführt:

Eine Pipette wurde auf 15 µl eingestellt und die Pipettenspitze in die Probe x-2 eingeführt (a). Vorsichtig wurde der komplette Tester2 mit möglichst wenig Öl in der Pipettenspitze aufgezogen. Als nächstes wurde etwas Luft aufgezogen, so dass ein kleiner Luftraum unter der Probe entstand (b). Dann wurde der frisch denaturierte Driver aufgezogen (c). Die Pipettenspitze sollte nun Tester2 und Driver durch Luft

getrennt voneinander enthalten (d). Der komplette Inhalt der Pipettenspitze wurde in das Gefäß mit der Tester1 der ersten Hybridisierung überführt und durch Auf- und Abpipettieren vorsichtig gemischt (e). Wenn nötig, wurde das Gefäß nach Schritt (e) zentrifugiert.

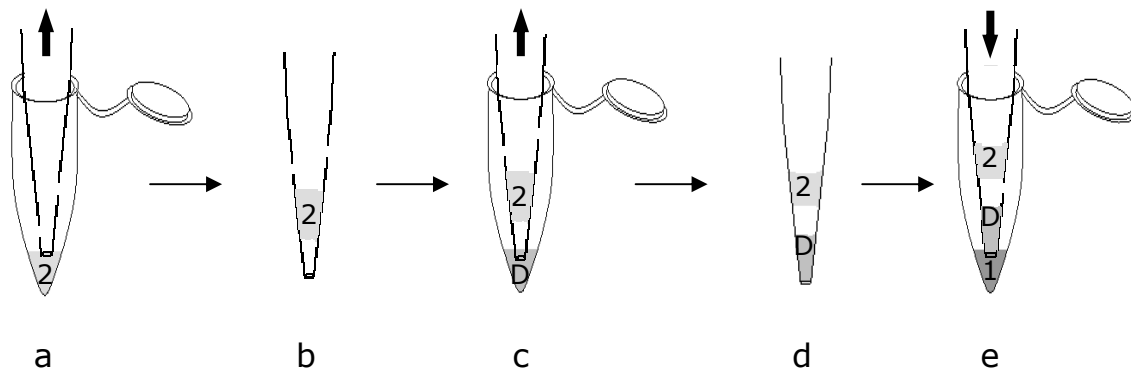


Abbildung 3.20: Gleichzeitiges Mischen des Drivers (D) mit den Tester1 (1) und Tester2 (2).

Nun existierte pro Richtung (sensitiv minus resistent bzw. resistent minus sensitiv) ein Reaktionsgefäß. Diese wurden im Thermocycler bei 68 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurden, um die Proben zu verdünnen, 200 µl Dilutionspuffer zu jeder Probe hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren gemischt, bevor die Proben im Thermocycler bei 68 °C 7 min erhitzt wurden.

3.9.11 PCR-Amplifikation

① *Differentiell exprimierte cDNAs sind nun gekennzeichnet durch zwei verschiedene Adapter an ihren Enden. Das ermöglichte eine selektive Amplifikation während der im Folgenden beschriebenen Reaktion. Vor der PCR werden die freien Enden während einer kurzen Inkubation bei 75 °C mit zu den Adaptern komplementären Sequenzen aufgefüllt. Dadurch entstehen die Bindungsstellen für den bei der folgenden PCR-Amplifikation verwendeten Primer 1, der in Abbildung 3.21 schwarz dargestellt ist. Während der ersten Amplifikation werden nur ds-cDNAs mit unterschiedlichen Adaptern an beiden Enden exponentiell amplifiziert.*

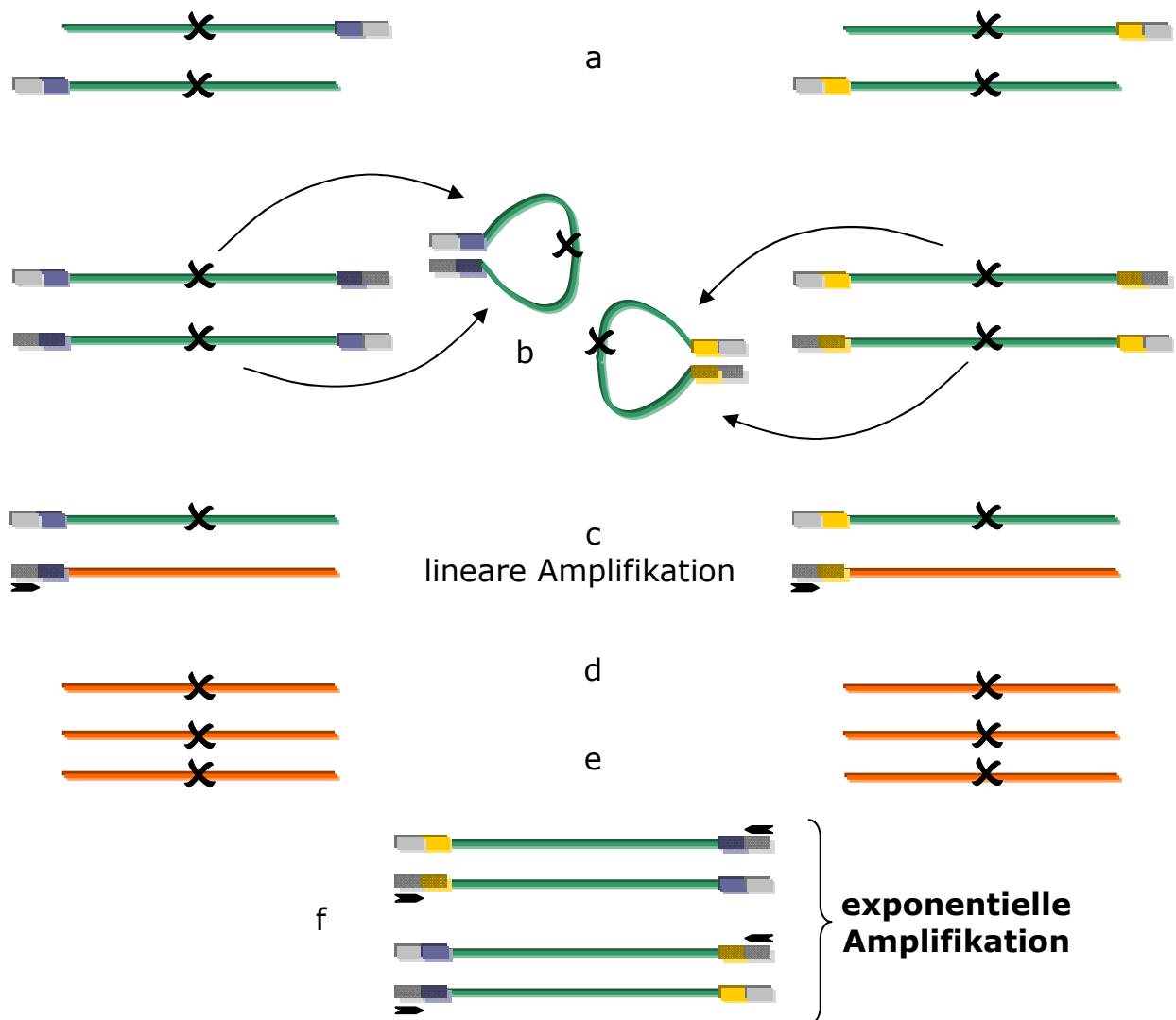


Abbildung 3.21: PCR-Amplifikation der Produkte der zweiten Hybridisierung mit Hilfe des PCR-Primer 1, der an die neu synthetisierten Bindungsstellen bindet.

Einzelstränge mit ligiertem Adapter (a) haben keine Primerbindungsstelle, ebenso wenig wie Einzel- oder Doppelstränge des Drivers (d, e). Doppelstränge mit gleichen Adaptern an beiden Enden (b) haben nach dem Auffüllen der freien 3'-Enden an jedem Strang zwei komplementäre Sequenzen, so dass sich diese nach der Denaturierung zu haarnadelartigen Strukturen zusammenlagern und keine freie Primerbindungsstelle mehr aufweisen. Hybride aus Adapter-ligiertem Tester und Driver haben nach dem Auffüllen der freien 3'-Enden nur eine Primerbindungsstelle und können daher nur linear amplifiziert werden. Einzig Tester-Doppelstränge, die zwei verschiedene Adapter an ihren Enden tragen (f), können aufgrund ihrer zwei Primerbindungsstellen exponentiell amplifiziert und so angereichert werden.

Während der zweiten Amplifikation wird eine Nested-PCR durchgeführt, um den Hintergrund weiter zu reduzieren und differentiell exprimierte Sequenzen weiter anzureichern. Dazu werden zwei verschiedene Primer eingesetzt, die den jeweils verschiedenen Sequenzen der beiden Adapter entsprechen. In Abbildung 3.21 sind diese Sequenzen blau bzw. gelb dargestellt.

Materialien

Advantage cDNA PCR Kit

- 10X cDNA-PCR-Reaktionspuffer
- 50X dNTP-Mix
- 50X Advantage-cDNA-Polymerase Mix

Clontech PCR-select™ cDNA Subtraction Kit

- PCR-Primer 1
- Nested-PCR-Primer 1
- Nested-PCR-Primer 2R
- steriles Wasser

Durchführung

Abweichend von dem Clontech-Protokoll wurden achtmal je 1,0 µl jeder verdünnten cDNA der zweiten Hybridisierung aliquotiert. Für die erste PCR, die mit jeder Probe 8fach durchgeführt worden ist, wurde ein Mastermix aus folgenden in Tabelle 3.18 aufgeführten Reagenzien mit einem Ansatz im Überschuss hergestellt.

Tabelle 3.18: Benötigte Reagenzien für je einen Ansatz der ersten PCR-Reaktion.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
H ₂ O	19,5 µl	-
10X PCR-Reaktionspuffer	2,5 µl	1X
dNTP-Mix	0,5 µl	je 200 µM
PCR-Primer 1	1,0 µl	400 nM
50X Advantage-cDNA-Polymerase Mix	0,5 µl	1X

Der Mastermix wurde geschüttelt und kurz zentrifugiert. In jedes Gefäß wurden 24 µl des Mastermixs aliquotiert und mit 50 µl Mineralöl über-

schichtet. Die Reaktionsansätze wurden anschließend im Thermocycler bei 75 °C für 5 min inkubiert, um die Adapter aufzufüllen. Dann wurde sofort mit der PCR unter den in Tabelle 3.19 angegebenen Bedingungen über 27 Zyklen (Zyklenzahl abweichend vom Clontech-Protokoll) fortgefahren.

Tabelle 3.19: PCR-Bedingungen für die erste PCR-Reaktion.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]
Denaturierung	94 °C	0,5
Annealing	66 °C	0,5
Elongation	72 °C	1,5

Nach 27 Zyklen wurden die PCR-Ansätze 1:1 000 verdünnt und davon je 1 µl als Template für eine erneute PCR verwendet. Diese zweite PCR entsprach im Reaktionsansatz und Protokoll den in Tabelle 3.18 und Tabelle 3.19 angegebenen Bedingungen und wurde mit je 3 Parallelansätzen pro Probe über 12 Zyklen durchgeführt.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden 1:10 verdünnt und davon je 1 µl als Template für die Nested-PCR eingesetzt. Die erste Nested-PCR wurde mit 3 Parallelansätzen durchgeführt. Dazu wurde ein Mastermix aus folgenden in Tabelle 3.20 angegebenen Reagenzien mit einem Ansatz im Überschuss hergestellt. Die Reagenzien wurden in der angegebenen Reihenfolge zusammen pipettiert.

Tabelle 3.20: Benötigte Reagenzien für je einen Ansatz der Nested-PCR.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
H ₂ O	18,5 µl	-
10X PCR Reaktionspuffer	2,5 µl	1X
50X dNTP-Mix	0,5 µl	je 200 µM
Nested PCR-Primer 1	1,0 µl	400 nM
Nested PCR-Primer 2R	1,0 µl	400 nM
50X Advantage-cDNA-Polymerase-Mix	0,5 µl	1X

Der Mastermix wurde vorsichtig durch Schütteln gemischt und kurz zentrifugiert. Je 24 µl des Mastermixes wurden zu je 1,0 µl des vorbereiteten, verdünnten Produktes der zweiten PCR gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsansätze wurden in den Thermocycler gesetzt und die PCR mit den in Tabelle 3.21 angegebenen Bedingungen über 12 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 3.21: PCR-Bedingungen für die Nested-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit [min]
Denaturierung	94 °C	0,5
Annealing	68 °C	0,5
Elongation	72 °C	1,5

Für eine zweite Nested-PCR wurden die PCR-Produkte dann erneut 1:10 verdünnt und davon wurde 1 µl als Template eingesetzt. Die zweite Nested-PCR wurde pro Probe mit 10 Parallelansätzen nach den in Tabelle 3.20 und Tabelle 3.21 angegebenen Bedingungen durchgeführt. Diese PCR-Produkte wurden für MOS eingesetzt (siehe Kapitel 3.10.2)

3.10 Eliminierung von falsch-positiven Sequenzen der SSH

3.10.1 Auftreten von falsch-positivem Hintergrund während der SSH

① *Es gibt zwei Möglichkeiten, wie falsch-positiver Hintergrund während der SSH entsteht und amplifiziert werden kann. Typ-I-Hintergrund entsteht, wenn lange Oligonukleotide nicht-ligierter Adapter sich unspezifisch an DNA-Sequenzen anlagern und während der PCR-Schritte amplifiziert werden. Sie können leicht mittels des Differentiellen Screenings (siehe Kapitel 3.10.4) erkannt werden, da sie kein unterschiedliches Signal zwischen beiden Proben zeigen. Dazu werden die PCR-Produkte beider cDNA-Banken parallel auf zwei Nylonmembranen geblottet, die SSH-Reaktionsansätze nach der Subtraktion (sensitiv minus resistent als Sens2*

und resistant minus sensitiv als Res2, siehe Seite 125) mit Digoxigenin markiert und diese Sonden mit den geblotten PCR-Produkten hybridisiert. Ist die entsprechende Sequenz zwischen den Gen-Banken differentiell exprimiert, zeigt sich ein unterschiedliches Signal nach der Detektion der Digoxigenin-markierten Hybride.

Die zweite Art Hintergrund, der so genannte Typ-II-Hintergrund, kann nicht mittels des Differentiellen Screenings mit Sonden aus den subtrahierten Proben erkannt werden, da er während Subtraktion entsteht und sich ebenso wie die tatsächlich differentiell exprimierten Sequenzen zu Doppelsträngen mit zwei verschiedenen Adaptern an beiden Enden zusammenlagert.

In Abbildung 3.22 ist gezeigt, wie es zum Auftreten dieses Typ-II-Hintergrundes kommt. Dargestellt sind zu Beginn zwei Kopien einer identischen Sequenz, die nach dem Verdau mit RsaI und Aufteilen der Probe zur Adapterligation statistisch genau einmal in beiden Ansätzen vorkommen. Die Sequenzen durchlaufen alle Schritte der SSH: die Adapterligation, die Denaturierung und die 1. Hybridisierung mit dem Driver. In diesem Schritt, der 1. Hybridisierung, ist es theoretisch möglich, dass sich komplementäre Stränge der Subtraktion durch den Driver entziehen und sich anschließend, während der 2. Hybridisierung, wieder zu einem Doppelstrang zusammenlagern, der zwei verschiedene Adapter an seinen Enden trägt und somit während der folgenden PCR ebenfalls, obwohl eigentlich nicht differentiell exprimiert, exponentiell amplifiziert wird.

Der Typ-I-Hintergrund kann sowohl durch das Differentielle Screening mit Sonden aus den subtrahierten, aber noch nicht mittels PCR amplifizierten, als auch aus den unsubtrahierten cDNAs erkannt werden, im Gegensatz zu dem Typ-II-Hintergrund der im Differentiellen Screening nur mit Sonden aus den unsubtrahierten cDNAs identifiziert werden kann. Jedoch ist bei dem Screening mit unsubtrahierten cDNAs das Problem, dass weniger stark exprimierte Sequenzen kein Signal auf dem Dot Blot zeigen und erst nach der Subtraktion und der zweimaligen Amplifikation mittels PCR so angereichert sind, dass sie ein Signal auf dem Dot Blot ergeben. Um dieses Problem zu umgehen, haben Rebrikov et al. eine Methode entwickelt, diesen Typ-II-Hintergrund zu eliminieren, die so genannte mirror orientation selection (MOS).¹⁰⁰

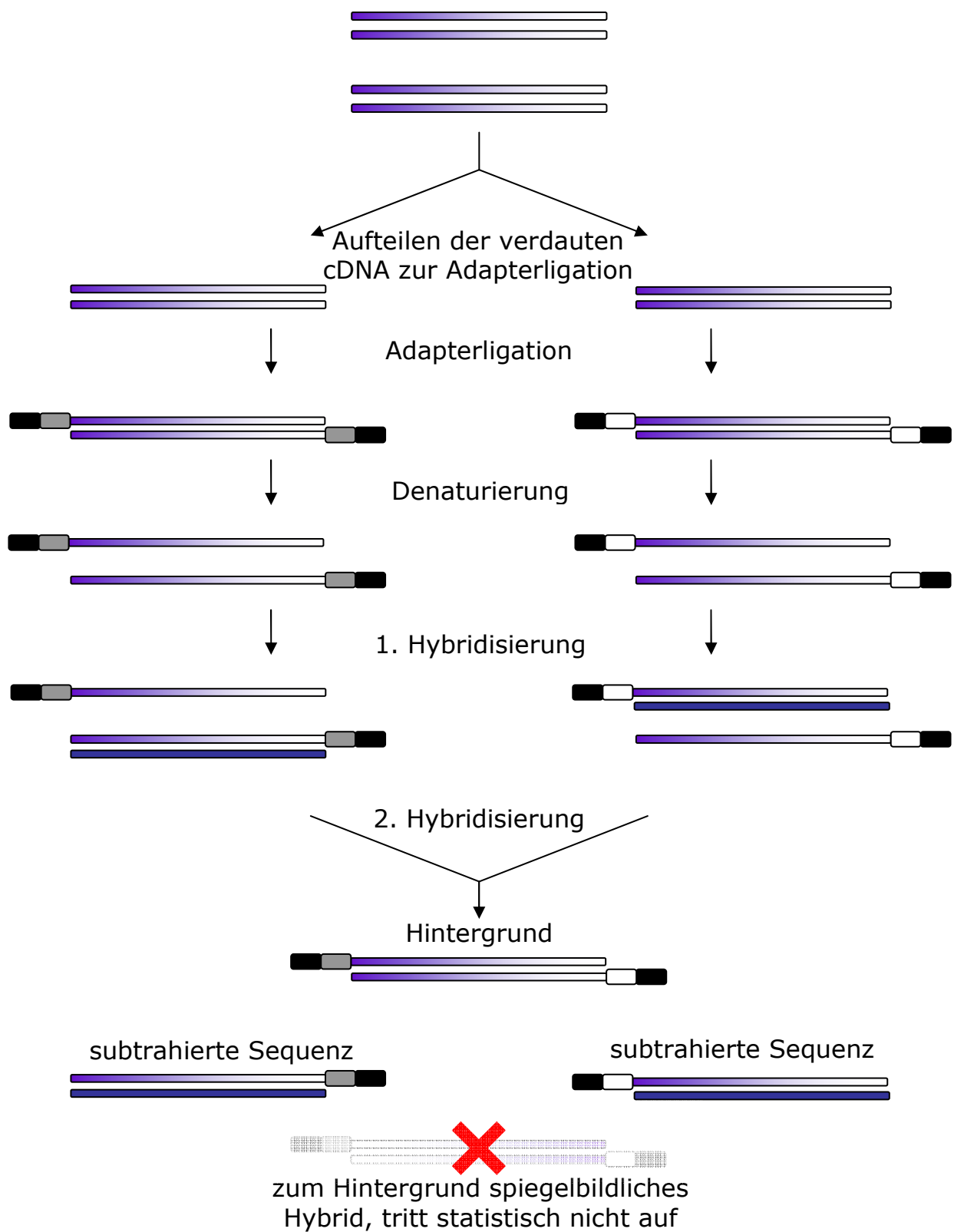


Abbildung 3.22: Genese des Typ-II-Hintergrundes während der SSH.

3.10.2 Eliminierung von Typ-II-Hintergrund der SSH

Mirror orientation selection (MOS)

① *Um zu erkennen, wie man den Typ-II-Hintergrund eliminieren kann, ist es an dieser Stelle wichtig zu verstehen, dass es statistisch sehr unwahrscheinlich ist, dass sich zusätzlich auch noch die beiden anderen Stränge der Subtraktion durch den Driver entziehen und sich dann ebenfalls zu einem Hybrid mit den beiden verschiedenen Adaptern an den Enden zusammenlagern. In Abbildung 3.22 ist dieses Molekül, das so entstehen würde, transparent abgebildet. Vergleicht man dieses statistisch nicht zusätzlich auftretende Hybrid mit dem Hintergrund, erkennt man die unterschiedliche Richtung beider Stränge, dargestellt durch den hellen ins dunkle übergehenden Strang bzw. umgekehrt. Im Unterschied zu den wirklich differentiell exprimierten Sequenzen, den Zielsequenzen, existiert von dem Hintergrund rein statistisch nur ein einzelnes Molekül pro Sequenz, das nur in einer Richtung vorliegt und erst während der PCR-Schritte exponentiell amplifiziert und daher gegenüber den subtrahierten Sequenzen angereichert wird.*

Während der MOS wird der in Abbildung 3.23 so genannte Adapter B, der ein Teil des Adapters 1 der SSH ist (s. Sequenz von Adapter 1 und Adapter B in Kapitel 12.1), von der Restriktionsendonuklease *SmaI* abgespalten. Nach der Denaturierung der Probe kommt es unter den Zielsequenzen zu einer neuen Durchmischung der Moleküle und zu neu gebildeten Hybriden, die an beiden Enden den Adapter A tragen. Da der Hintergrund nur in einer Orientierung vorhanden ist, kann sich dieser nur erneut zu den ursprünglichen Hybriden zusammenlagern, die an nur einem Ende den Adapter A tragen. Analog zu der SSH werden die freien 3'-Enden aufgefüllt. Während der sich anschließenden PCR mit NP2Rs-Primern, die an einen Teil von Adapter A binden, können nur die Hybride, die an beiden 3'-Enden Adapter tragen, exponentiell amplifiziert werden. So wird die Zielsequenz im Vergleich zum Hintergrund angereichert (vergleiche Abbildung 3.23).

Materialien und Geräte

Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (24:24:1)

Chloroform : Isoamylalkohol (24:1)

PCR-selectTM cDNA Subtraction Kit

4X Hybridisierungspuffer
Dilutionspuffer
4 M NH_4OAc
Ethanol absolut p. a.
Ethanol 80%ig
NP2Rs-Primer
NTE-Puffer
SmaI, #ER0661, Fermentas Life Science [10 U/ μl]
mit 10X Puffer TangoTM
50 mM EDTA-Lösung, S4809, Sigma
Advantage cDNA PCR Kit
10X cDNA-PCR-Reaktionspuffer
50X dNTP-Mix
50X Advantage-cDNA-Polymerase-Mix
Thermocycler

Durchführung

Sechs der zehn PCR-Produkte jeder Nested-PCR wurden vereint und 140 μl in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Dazu wurden 140 μl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol gegeben, die Proben gründlich geschüttelt und anschließend 10 min bei RT und 14 000 rpm zentrifugiert. Dann wurden die oberen, wässrigen Phasen vorsichtig in neue Gefäße überführt und mit 140 μl Chloroform : Isoamylalkohol versetzt, geschüttelt und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Erneut wurden die oberen, wässrigen Phasen vorsichtig in neue Gefäße überführt. Um dann die DNA zu fällen, wurden 70 μl 4 M NH_4OAc und 525 μl 95%iger Ethanol hinzugegeben, die Gefäße gründlich geschüttelt und bei RT für 20 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden vorsichtig entfernt und die Pellets je mit 200 μl 80%igem Ethanol gewaschen. Anschließend wurde der Ethanol entfernt und die Pellets an der Luft trocknen gelassen. Sobald der restliche Ethanol verdunstet war, wurden die Pellets je in 7,5 μl NTE-Puffer aufgenommen und, wie in Kapitel 3.7.4 beschrieben, quantifiziert.

54 ng cDNA jeder Probe wurden mit NTE-Puffer zu 9,5 μl ergänzt. Nach Zugabe von 5 U SmaI wurden die Proben bei 37 °C für 1 h im Thermocycler inkubiert, bevor der Verdau durch Zugabe von 4 μl 50 mM EDTA-Lösung und 10 min Inkubation bei 70 °C im Thermocycler gestoppt wurde. 7 ng jeder verdauten cDNA wurden mit 1,0 μl Hybridisierungspuffer und 1,2 μl Ampuwa gemischt und im Thermocycler für 90 sec bei 95 °C denaturiert.

Für das Reannealing wurden die Proben 3 h bei 68 °C im Thermocycler inkubiert, anschließend durch Zugabe von je 200 µl Dilutionspuffer verdünnt und erneut für 10 min bei 70 °C im Thermocycler inkubiert. Pro folgender PCR-Reaktion wurden 1,0 µl der verdünnten cDNA als Template eingesetzt. Pro Probe wurden vier PCR-Ansätze mit den in Tabelle 3.22 angegebenen Reagenzien angesetzt und die PCR mit den in Tabelle 3.23 angegebenen Bedingungen über 30 Zyklen durchgeführt.

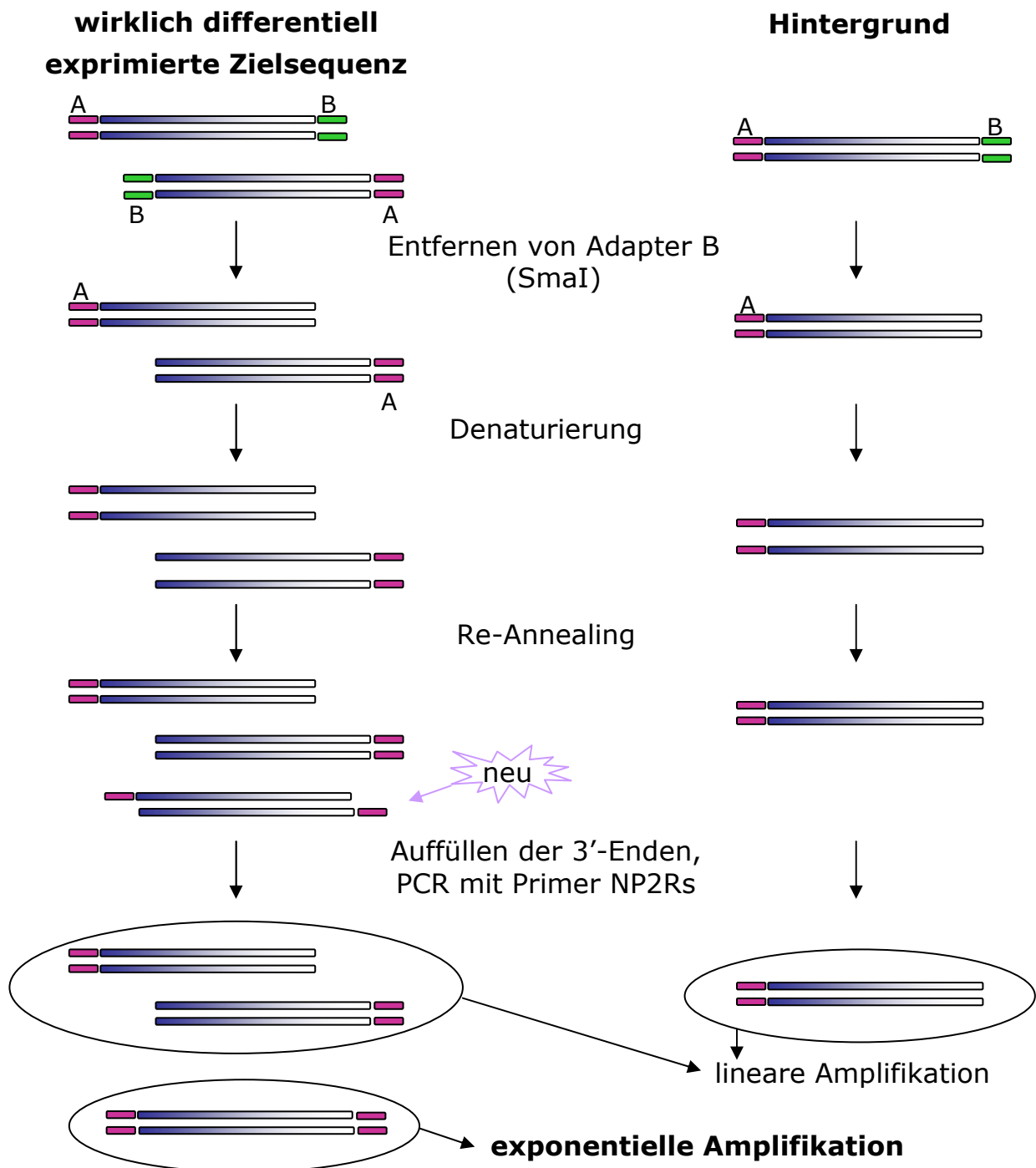


Abbildung 3.23: Ablauf der *mirror orientation selection* (MOS). Nähere Erläuterungen im Text.

Tabelle 3.22: Reaktionsansatz für die PCR der MOS-selektierten cDNAs.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
Template	1,0 µl	-
50X Advantage-cDNA-Polymerase-Mix	0,4 µl	1X
10X Puffer	2,0 µl	1X
NP2Rs-Primer	1,0 µl	600 nM
50X dNTPs	0,4 µl	1X

Tabelle 3.23: PCR-Bedingungen für die PCR der MOS-selektierten cDNAs.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	60 sec
30 Zyklen	Denaturierung	95 °C 20 sec
	Annealing	62 °C 20 sec
	Elongation	72 °C 120 sec
finale Elongation	72 °C	300 sec

Trennung auf einem Polyacrylamidgel

Materialien und Geräte

CleanGel Long-10

100 bp DNA Ladder

steriles H₂O

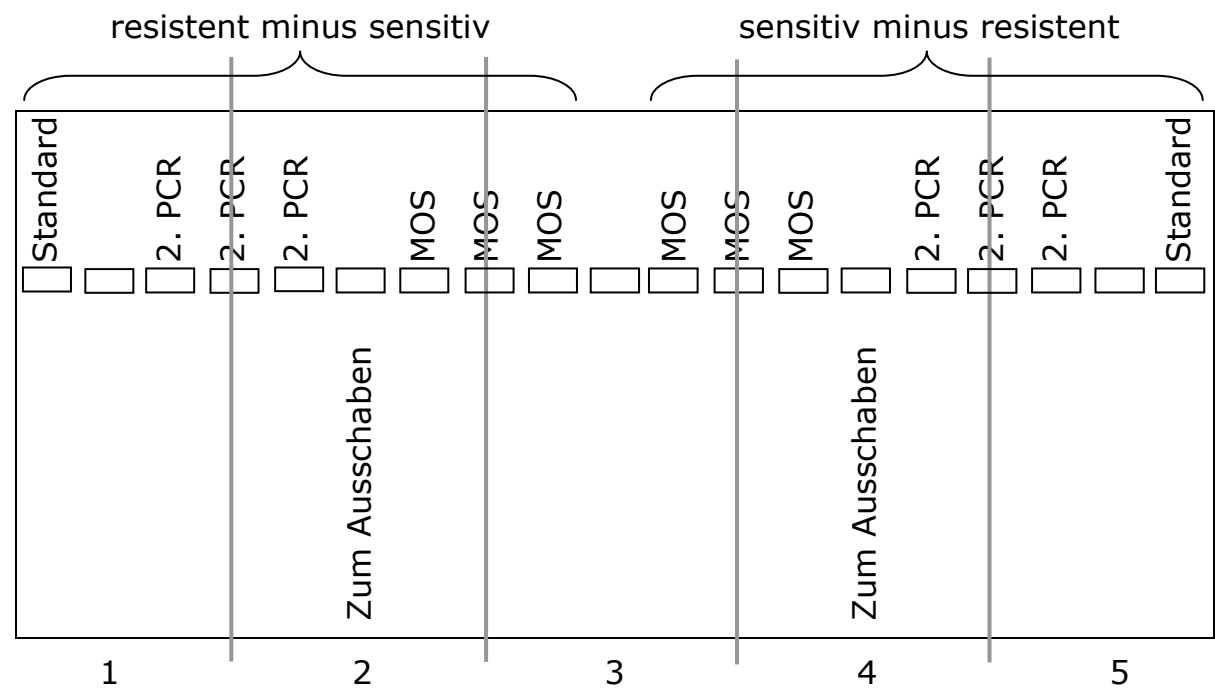
Skalpell

Apparatur siehe 3.9.6

Durchführung

Das Polyacrylamidgel *CleanGel Long-10* wurde analog zu dem DNA-HP 15%-Polyacrylamidgel rehydriert und vorbereitet (siehe Kapitel 3.9.6). Je 8 µl der PCR-Produkte der 2. Nested-PCR (siehe Kapitel 3.9.11) bzw. der PCR nach MOS (siehe Kapitel 3.10.1) wurden neben dem DNA-Standard (0,5 µl *100 bp DNA Ladder* ad 6,5 µl steriles H₂O) auf das Polyacrylamidgel *CleanGel Long-10* entsprechend Abbildung 3.24 aufgetragen.

Abbildung 3.24: Gel-Ladeschema für das Polyacrylamid-Long-Run-Gel zum Ausschaben der Fragmente und Zerschneiden des Geles in 5 Teile, von denen Teil 1, 3 und 5 mittels Silberfärbung angefärbt wurden und Teile 2 und 4 dem Ausschaben der Banden dienen.



Die Gelelektrophorese wurde unter den in Tabelle 3.24 aufgezeigten Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3.24: Bedingungen für die Elektrophorese des Polyacrylamidgels *CleanGel Long-10* für die Auftrennung der PCR-Produkte.

max. Spannung [V]	max. Stromstärke [mA]	max. Leistung [W]	Zeit [min]
150	15	5	30
400	31	12	10
500	25	12	45
800	28	13	140
Σ 225			

Vor der Silberfärbung wurden Teil 2 und Teil 4 des Gels (siehe Abbildung 3.24) mit einem Skalpell herausgeschnitten und nur die Teile 1,3 und 5 des Gels wurden einer Silberfärbung unterworfen (Durchführung siehe Kapitel 3.9.6). Auf einem karierten Blatt Papier wurden die fünf Teile des Gels mit Tesafilm wieder zusammengeklebt. Die angefärbten Gelstücke dienten als Orientierung, wie weit in etwa die Banden gelaufen waren. Mit einem Skalpell wurden aus den nicht angefärbten Teilen die Banden ausgeschabt und jeweils in separate PCR-Gefäße, die 35 µl H₂O enthielten, überführt. Zum Lösen der PCR-Produkte aus dem Gel wurde das Wasser mit der Pipette mehrmals auf- und abpipettiert.

Zur Kontrolle wurden nach dem Ausschaben auch die Teile 2 und 4 des Gels angefärbt, um sicherzustellen, dass wirklich die Banden ausgeschabt worden waren. Anschließend wurde eine weitere Nested-PCR mit den in H₂O gelösten, ausgeschabten Fragmenten über 30 Zyklen durchgeführt. Die Bedingungen waren identisch mit der bei der PCR-Amplifikation beschriebenen Nested PCR (siehe Kapitel 3.9.11).

3.10.3 Isolierung der PCR-Produkte aus der SSH

Transformation in *E. coli*

① Jede ausgeschabte und in Wasser gelöste Bande des Polyacrylamidgels ist ein Gemisch verschiedenster PCR-Produkte etwa gleicher Länge. Um dieses Gemisch zu trennen, bedient man sich der Hilfe von *E. coli*. Nach dem Einbau der PCR-Produkte in einen Plasmid-Vektor werden diese rekombinanten Vektoren in *E. coli* transformiert, wobei jede Bakterienzelle maximal einen Vektor aufnimmt. Durch das Ausstreichen der *E. coli* auf Agarplatten werden die Bakterienzellen vereinzelt, so dass sie in Kolonien wachsen können und jede Kolonie aus einer Bakterienzelle hervorgegangen ist. Diese einzelnen Bakterienkolonien wiederum können dann gepickt und in LB-Medium weiter kultiviert werden. Ein Teil dieser Bakteriensuspension wird nach Verdünnen mit Wasser durch Aufkochen lysiert, so dass die Bakterienzellwände zerstört und die vermehrten Plasmide freigesetzt werden. Sie sind dann einer PCR-Reaktion zugänglich, um aus dem Plasmid das zuvor eingebaute PCR-Fragment zu amplifizieren. Das entstehende PCR-Produkt ist dann hervorgegangen aus einem PCR-Fragment und kann mit Hilfe der verwendeten PCR-Primer auch sequenziert werden.

Um die Bakterien zu selektieren, die ein Plasmid aufgenommen haben, trägt das Plasmid ein **Ampicillin-Resistenzgen**. Wenn man den Agarplatten Ampicillin zusetzt, wachsen nur die transformierten *E. coli*. Mit Hilfe der Blau-Weiß-Selektion ist es auch möglich, die *E. coli* danach zu unterscheiden, ob sie nur das ursprüngliche Plasmid oder ein gewünschtes rekombinantes Plasmid, das ein PCR-Fragment eingebaut hat, aufgenommen haben. Denn die PCR-Fragmente werden genau an der Stelle in den Vektor eingebaut, der das *lacZ*-Gen trägt. *lacZ* kodiert für die β -Galaktosidase. Durch den Einbau der Fremd-DNA wird die Sequenz von *lacZ* zerstört. Ist den Agarplatten X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid), ein Substrat für die β -Galaktosidase, zugesetzt, wird in den wachsenden Bakterienkolonien, die die β -Galaktosidase ablesen, X-Gal gespalten und durch den Luftsauerstoff zum blauen Indigofarbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert (siehe Abbildung 3.25). Diese Bakterienkolonien wachsen blau, diejenigen, die ein rekombinantes Plasmid aufgenommen haben, dagegen weiß.

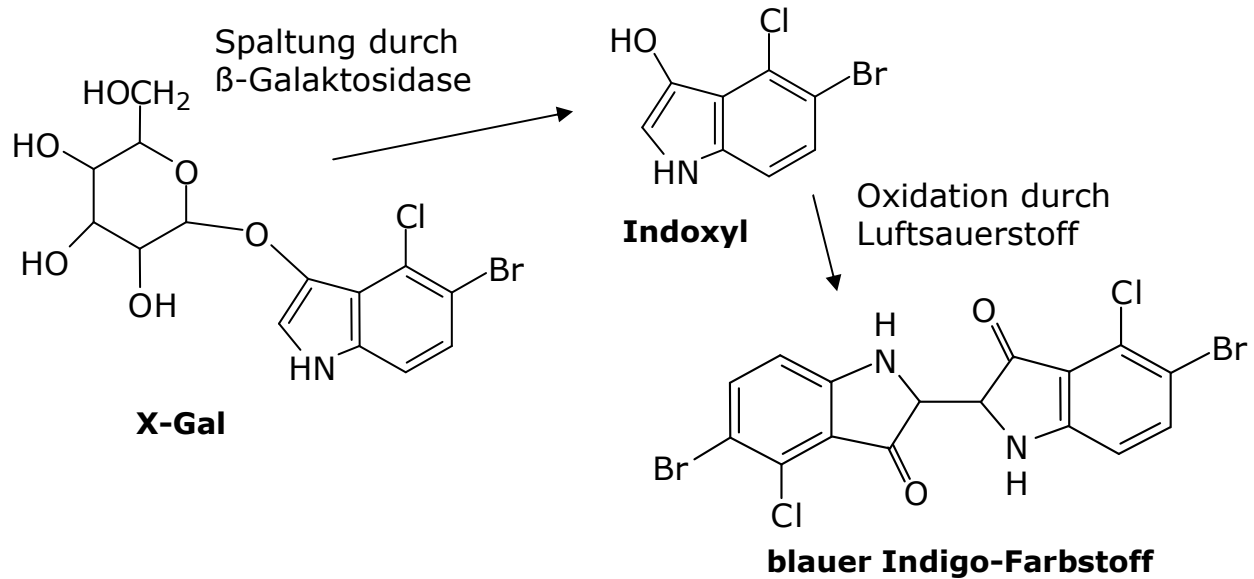


Abbildung 3.25: Farbreaktion der Blau-Weiß-Selektion von Bakterienzellen. X-Gal wird durch die von den transformierten Bakterien produzierte β-Galaktosidase zum Indoxyl gespalten, das durch den Luftsauerstoff zum blauen Indigofarbstoff oxidiert wird, der die Bakterienkolonien blau färbt. Kolonien nicht transformierter Bakterien wachsen weiß.

Der Einbau der PCR-Produkte in den Vektor geschieht mit Hilfe der TOPO-TA-Klonierungsstrategie von Invitrogen. Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ist mit einem 3'-Thymidin-Überhang linearisiert. Die Taq-Polymerase besitzt eine terminale Transferase-Aktivität, die einzelne Desoxyadenosine an das 3'-Ende des PCR-Produkts anfügt. Dies ermöglicht die effiziente Ligation des PCR-Fragments in den Vektor.

Materialien und Geräte

Topo TA Cloning Kit

TOP10F' chem. kompetente E. coli

pCR[®]2.1-TOPO[®] (10 ng/μl Plasmid-DNA), Vektorkarte s. 12.4

Salzlösung (1,2 M NaCl, 0,06 M MgCl₂)

M13-Primer

SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose)

LB-Medium

DMSO

Eis

96-Well-Platte

Ampuwa®

Ampicillin-Agarplatten (für Blau-Weiß-Screening)

Wasserbad, 42 °C

Schüttler, 37 °C

Schüttler, RT

Heizblock, 100 °C

Trockenschrank, 37 °C

Parafilm

Durchführung

Folgende Schritte wurden für jedes PCR-Produkt aus den ausgeschabten Banden durchgeführt: 4 µl des PCR-Produktes wurden mit 1,0 µl Salzlösung und 1,0 µl TOPO®-Vektor vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren in einem sterilen 1,5-ml-Reaktionsgefäß gemischt und 15 min bei RT stehen gelassen. Nach dem Stoppen der Reaktion auf Eis wurden 2 µl des Reaktionsansatzes zu den kompetenten E. coli gegeben, die zuvor langsam auf Eis aufgetaut sind. Gemischt wurde durch vorsichtiges Rühren mit der Pipettenspitze, um die E. coli nicht zu beschädigen. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min auf Eis gelagert. Für den folgenden Hitzeschock wurde das Reaktionsgefäß für 30 sec in ein auf 42 °C vorgewärmtes Wasserbad gehalten und danach direkt auf Eis, bevor 250 µl auf RT vorgewärmtes SOC-Medium hinzugegeben wurden.

Der Ansatz wurde für 1 h bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt und dann auf eine vorgewärmte Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag konnten einzelne, möglichst weiße Kolonien gepickt werden. Zuvor wurde eine 96-Well-Platte je benötigtem Well mit 200 µl LB-Medium befüllt, so dass jeder gepickte Klon in ein Well überführt werden konnte. Je Agarplatte wurden, wenn möglich, 64 Klone gepickt. Die Mikrotiterplatte wurde 4 h bei RT und 150 rpm geschüttelt. Für die Lyse der Bakterienzellen wurde pro gepicktem Klon ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß mit 15 µl Ampuwa® vorbereitet, in das 5 µl Bakteriensuspension aus dem entsprechenden Well der Mikrotiterplatte überführt wurden. Die verdünnten E.coli-Suspensionen wurden durch 10-minütiges Erhitzen im 100 °C heißen Heizblock lysiert. In jedes Well der Mikrotiterplatte wurden 20 µl DMSO gegeben und die Platte mit Parafilm verschlossen, um die Bakteriensuspension bei -80 °C zu lagern.

PCR der Bakterienlysate

Materialien und Geräte

Enhanced Avian HS RT-PCR Kit

dNTP-Mix [10 mM je dNTP]

JumpStart-AccuTaq-LA-DNA-Polymerase [2,5 U/μl]

10X AccuTaq-Puffer [50 mM Tris-HCl, 150 mM (NH₄)₂SO₄,
pH 9,3, 25 mM MgCl₂, 1 % Tween[®] 20]

NP2Rs-Primer

Ampuwa[®]

Vorbereitung

Da der 10X AccuTaq-Puffer einen hohen pH-Wert hat, fällt beim Einfrieren des Puffers Magnesiumhydroxid aus. Um dieses wieder zu lösen, musste der Puffer vor Benutzung erwärmt und geschüttelt werden.

Durchführung

Um aus den Bakterienlysaten die Inserts zu isolieren und anzureichern, wurde mit jedem Lysat als Template eine PCR durchgeführt. Dazu wurde aus den in Tabelle 3.25 aufgeführten Reagenzien **(ohne Bakterienlysat)** ein Mastermix mit 10%igem Schwundüberschuss angesetzt.

Tabelle 3.25: Reagenzien und Volumina für die Bakterienlysate-PCR.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
10X Puffer	2,2 μl	1X
AccuTaq-Polymerase	0,45 μl	0,05 U/μl
dNTP-Mix	0,45 μl	200 μM je dNTP
NP2Rs-Primer	0,7 μl	400 nM
Ampuwa	16,2 μl	-
Bakterienlysate	2,5 μl	-

Je PCR-Reaktionsgefäß wurden 20,0 µl des Mastermixes vorgelegt und 2,5 µl des Bakterienlysats als Template hinzugegeben. Die PCR wurde entsprechend den in Tabelle 3.26 angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Tabelle 3.26: PCR-Bedingungen für die PCR aus Bakterienlysaten.

Schritt	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	2 min	94 °C
30 Zyklen	Denaturierung	20 sec
	Annealing	30 sec
	Elongation	1 min
finale Elongation	10 min	72 °C

Screening der PCR-Produkte auf Agarosegelen

Wie in Kapitel 3.7.5 beschrieben, wurden die PCR-Produkte aller Klone auf 2%igen DNA-Gelen analysiert. Nur MOS-positive Fragmente konnten in der PCR mit NP2Rs-Primern amplifiziert werden und nur diese gaben ein Bandensignal auf dem Agarosegel. Abbildung 3.26 zeigt ein NP2Rs-flankiertes MOS-positives PCR-Produkt.

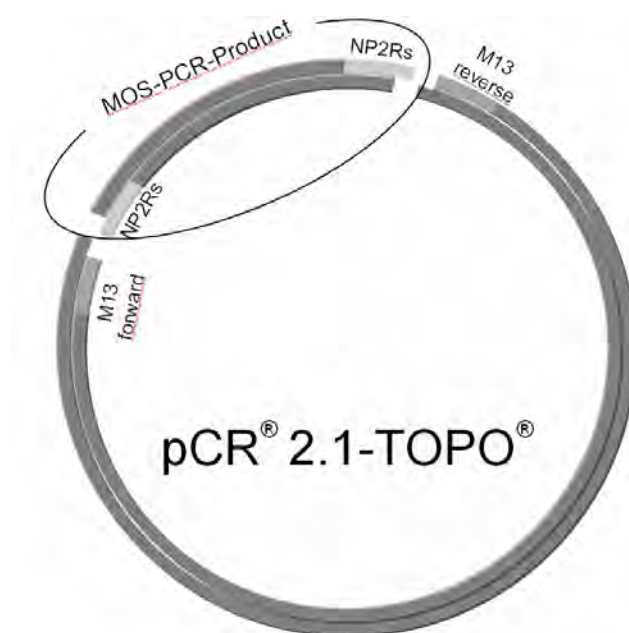


Abbildung 3.26: Einbau der MOS-PCR-Produkte in pCR® 2.1-TOPO® und entsprechende Amplifikation mit NP2Rs-Primern.

3.10.4 Differentielles Screening der PCR-Produkte aus der SSH

Fixierung der PCR-Produkte auf Nylonmembranen

① Um zu überprüfen, ob die nach dem Screening auf Agarosegelen identifizierten PCR-Produkte tatsächlich differentiell exprimierten Sequenzen entsprechen, werden diese auf zwei identischen Membranen fixiert (siehe Abbildung 3.27 I.). Sowohl aus der resistenten als auch der sensitiven mRNA werden dann Sonden generiert, d. h. sie werden mit Digoxigenin-markiertem dUTP (DIG-dUTP) markiert (II.). Jede Sonde wird mit einer der identischen Membranen hybridisiert (III.), wobei differentiell exprimierte Sequenzen Unterschiede in der Hybridisierungsintensität zeigen. Daraufhin können die DIG-dUTPs mit Antikörperfragmenten detektiert werden (IV.). An die Antikörperfragmente ist Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert, die das Substrat CSPD unter Lichtemission spaltet (V.). Diese Lichtemission kann anschließend auf Röntgenfilmen detektiert werden.

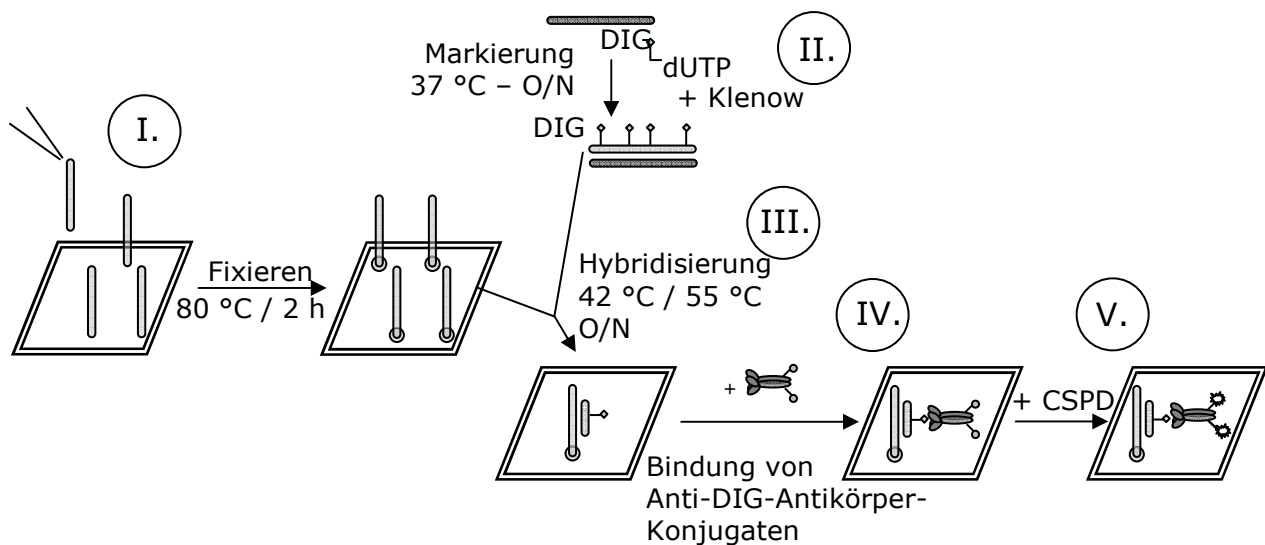


Abbildung 3.27: Durchführung des Differentiellen Screenings.

- I. Fixierung der PCR-Produkte auf Nylonmembranen**
- II. Sondenmarkierung mit DIG-dUTPs durch Klenow**
- III. Hybridisierung der Sonden mit den fixierten PCR-Produkten**
- IV. Detektion mit Anti-DIG-Antikörper-Konjugaten**
- V. Umsetzen des Substrates CSPD unter Lichtemission**

O/N = engl. *over night*, über Nacht

Material und Methoden

DIG Wash and Block Buffer Set

10X Waschpuffer [1 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl, pH 7,5 bei 20 °C, 3 % Tween[®] 20 (v/v)]

10X Maleinsäurepuffer [1 M Maleinsäure, 1,5 M NaCl, pH 7,5 bei 20 °C]

10X Blockierungslösung [10X Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer]

10X Detektionspuffer [1 M Tris-HCl, pH 9,5, 1 M NaCl]

alle Puffer-Konzentrate bei -20 °C zu lagern

daraus sind folgende Arbeitslösungen herzustellen:

1X Waschpuffer [10X Waschpuffer 1:10 mit Reinstwasser verdünnen], bei RT zu lagern

2X Maleinsäurepuffer [10X Maleinsäurepuffer 1:5 mit Reinstwasser verdünnen], bei RT zu lagern

1X Maleinsäurepuffer [10X Maleinsäurepuffer 1:10 mit Reinstwasser verdünnen], bei RT zu lagern

1X Blockierungslösung [10X Blockierungslösung 1:10 mit 1X Maleinsäurepuffer verdünnen], bei Bedarf frisch herzustellen

1X Detektionspuffer [10X Detektionspuffer 1:10 mit Reinstwasser verdünnen], bei RT zu lagern

DIG- High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II

5X *DIG-High Prime* [Random Primer, Nukleotide, DIG-dUTP, Klenow Enzym und Puffer, keine genauen Konzentrationsangaben]

DIG-markierte Kontroll-DNA

DNA-Verdünnungspuffer [50 µg/ml Fischsperma-DNA in 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0 bei 25 °C]

Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat vom Schaf, Fab-Fragment [750 U/µl]

CSPD-Substratlösung

DIG Easy Hyb-Granulat [keine weitere Angabe]

10X Blockierungslösung

daraus sind herzustellen:

Anti-Digoxigenin-Antikörperlösung [0,1 µl Anti-Digoxigenin-AP-Konjugat/1 ml 1X Blockierungslösung],
bei Bedarf frisch herzustellen

DIG Easy Hyb-Lösung [Zusatz von 64 µl Reinstwasser in zwei Portionen, Lösen durch Mischen und Erhitzen auf 37 °C]

Biodyne[®] PLUS Membrane, Art. Nr. 732-3025, KMF Laborchemie Handels-GmbH

PCR-Produkte, die auf Agarosegelen positiv waren

3,4 N NaOH

hochstringente Waschlösung

mittelstringente Waschlösung

niedrigstringente Waschlösung

Strip-Lösung

Trockenschrank

Durchführung

10 µl jedes zu untersuchenden PCR-Produktes (entsprach etwa 20 ng DNA) der Klonierung wurden nach Zusatz von 1,0 µl 3,4 N NaOH (final 0,3 N NaOH) für 10 min bei 95 °C und anschließend schnellem Abkühlen auf Eis denaturiert. Mikroliterweise, immer zwischendurch lufttrocknen lassend, wurden je 5 µl jeder Probe auf zwei parallele, positiv geladene Nylonmembranen pipettiert. Nach dem Auftragen aller Proben wurden die Membranen durch Bedecken mit 1X TE-Puffer pH 7,5 neutralisiert, in Millipore-Wasser gewaschen und zur Immobilisierung der Nukleinsäuren bei 80 °C im Trockenschrank 2 h inkubiert. Jede Membran wurde im Duplikat hergestellt, damit anschließend direkt die Sonde aus der resistenten mit der Sonde aus der sensitiven Zelllinie miteinander verglichen werden konnte.

Sondenmarkierung mit Digoxigenin

① *DIG-dUTP ist ein mit dem Steroidhapten Digoxigenin (DIG) markiertes dUTP (siehe Abbildung 3.28), mit dem DNA-Proben für die Hybridisierung und anschließende Chemilumineszenz-Detektion mittels Enzymimmunoassay markiert werden können. Dazu dient denaturierte DNA als Matrize und das Klenow-Fragment synthetisiert in Gegenwart von Random-Hexameren den komplementären DNA-Strang, in den die angebotenen DIG-markierten, alkalilabilen dUTPs neben den anderen dNTPs eingebaut werden. Im Durchschnitt wird etwa alle 20 bis 25 Nukleotide ein DIG-dUTP eingebaut. Der Vorteil der Markierung mit Random-Primern ist, dass alle Fragmente des Templates in etwa gleichem Ausmaß umgeschrieben werden. Auch wird eine gewisse Amplifikation erreicht, da die zuerst synthetisierten Stränge von der nächsten herannahenden Polymerase verdrängt werden und die Matrize mehrfach abgelesen werden kann.*

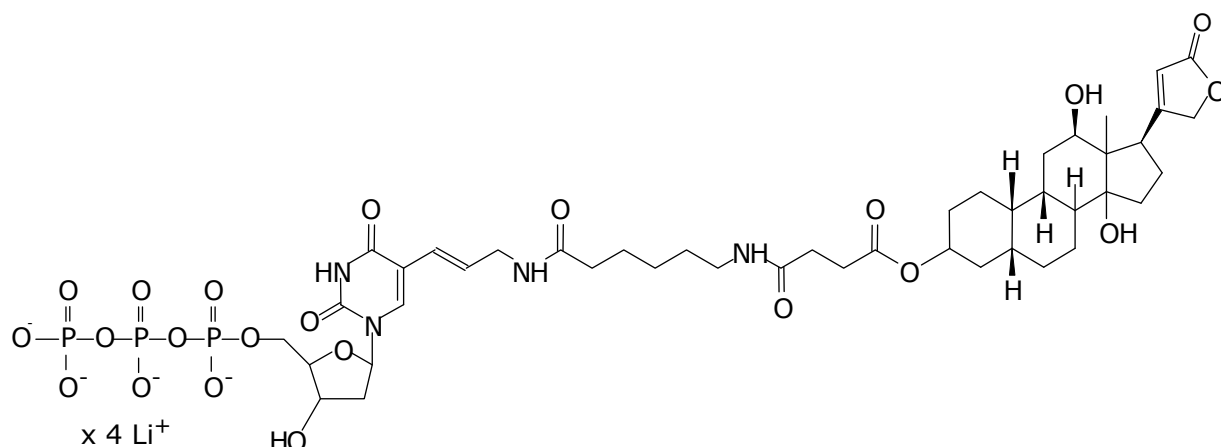


Abbildung 3.28: Strukturformel von DIG-dUTP.

Materialien und Geräten

Thermocycler

DIG- High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II

5X DIG-High Prime

50 mM EDTA-Lösung, S4809, Sigma

Durchführung

Sonden wurden aus folgenden Proben hergestellt:

Res1: unsubtrahierte, RsaI-verdaute cDNA der resistenten Zelllinie

Sens1: unsubtrahierte, RsaI-verdaute cDNA der sensitiven Zelllinie

Res2: subtrahierte cDNA (res minus sens, vor PCR-Amplifikation)

Sens2: subtrahierte cDNA (sens minus res, vor PCR-Amplifikation)

Für jede Sonde wurden 100 ng der entsprechenden DNA mit Ampuwa zu 16,0 µl ergänzt und durch 10-minütiges Erhitzen auf 95 °C und anschließend schnelles Kühlen auf Eis denaturiert. Nach Zugabe von 4,0 µl *DIG-High Prime* wurde die Probe über Nacht (ca. 15 h) bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Diese Markierungsreaktion wurde durch Zugabe von 2,0 µl 50 mM EDTA-Lösung und 10-minütiges Erhitzen im Thermocycler auf 65 °C gestoppt.

Kontrolle der Markierungseffizienz

① *Um sicherzustellen, dass jeweils die beiden zu vergleichenden Sonden in ähnlichem Ausmaß mit DIG markiert worden sind, werden die markierten Sonden in verschiedenen Verdünnungen direkt auf der Nylonmembran fixiert. Ebenso wird mit der DIG-markierten Kontroll-DNA verfahren, und alle Blots werden detektiert.*

Benötigte Lösungen

Hybridisierungs-Röhrchen [15-ml-PP-Röhrchen mit Aluminiumstange]

Schüttler

Frischhaltefolie

Kassette

Durchführung

Als Hybridisierungsröhrchen wurden 15-ml-PP-Röhrchen verwendet, in denen zentral eine 10,5 cm lange Aluminiumstange platziert wurde, um das benötigte Volumen an Lösungen zu halbieren.

Die Verdünnungsreihe der DIG-markierten Kontroll-DNA wurde mit DNA Verdünnungspuffer zu folgenden Konzentrationen hergestellt: 10 pg/μl – 3 pg/μl – 1 pg/μl – 0,3 pg/μl. Für alle DIG-markierten Sonden wurde mit DNA-Verdünnungspuffer folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 1/600 – 1/2 000 – 1/6 000 – 1/20 000. Diese Verdünnungen entsprechen den Konzentrationen der Verdünnungsreihe der Kontroll-DNA, wenn man davon ausgeht, dass aus den eingesetzten 100 ng DNA während der Markierung 1 000 ng markierte DNA geworden sind (basierend auf den Angaben des Herstellers). 1,0 μl jeder Probe wurde auf die Membran pipettiert und bei 80 °C im Trockenschrank für 2 h fixiert. Vor der sich anschließenden immunologischen Detektion wurde die Membran kurz in 1X Maleinsäurepuffer gewaschen.

Immunologische Detektion

① *Die während der immunologischen Detektion eingesetzte Blockierungslösung besetzt unspezifische Bindungsstellen auf der Membran, so dass falsche Bindungen des Antikörpers verhindert werden. Die Antikörperlösung enthält das Fab-Fragment eines Digoxigenin-Antikörpers vom Schaf, der an*

das Enzym Alkalische Phosphatase (AP) konjugiert ist. Sobald das Substrat für die AP, Dinatrium-3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]-decan-4-yl)-phenylphosphat (CSPD), angeboten wird, führt die enzymatische Dephosphorylierung von CSPD durch die Alkalische Phosphatase zur Bildung eines metastabilen Dioxethan-Phenolat-Anions, welches zerfällt und in gepufferter Lösung Licht der Wellenlänge $\lambda = 477 \text{ nm}$ emittiert (siehe Abbildung 3.29). Diese Chemilumineszenz kann auf Röntgenfilmen erfasst werden.

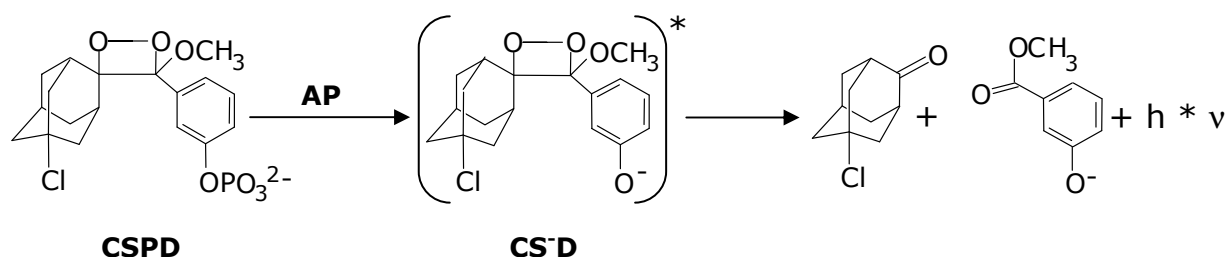


Abbildung 3.29: Chemilumineszenz-Reaktion von CSPD.

AP = Alkalische Phosphatase

CSPD = Dinatrium-3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'-chlor)-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]-decan-4-yl)-phenylphosphat

Materialien und Geräte

DIG Wash and Block Buffer Set

- 1X Waschpuffer
- 1X Maleinsäurepuffer
- 1X Blockierungslösung
- 1X Detektionspuffer

DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II

- DIG-markierte Kontroll-DNA
- DNA Verdünnungspuffer
- Anti-Digoxigenin-Antikörperlösung
- CSPD-Substratlösung
- DIG Easy Hyb*-Lösung

Durchführung

Die Schritte der immunologischen Detektion wurden in Hybridisierungsröhrchen bei leichtem Schütteln und, soweit nicht anders angegeben, bei

RT durchgeführt: Die Membran wurde für 5 min im Waschpuffer gewaschen, für 30 min in 1X Blockierungslösung und anschließend für 30 min mit Antikörperlösung inkubiert. Während dieser 30minütigen Inkubation mit der Antikörperlösung konnte der Antikörper an die DIG-markierte DNA binden. Ungebundener Antikörper wurde anschließend durch zweimaliges 15-minütiges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Dann wurde die Membran über 2 bis 5 min mit Detektionspuffer equilibriert, bevor sie aus dem Hybridisierungsröhrchen in die Belichtungskassette gelegt wurde. Darin wurde die Membran mit CSPD-Lösung benetzt und zum Schutz vor Austrocknen mit Frischhaltefolie bedeckt, bevor die überschüssige CSPD-Lösung vorsichtig zu den Seiten hin ausgestrichen und mit fusselfreiem Wischtuch aufgenommen wurde. Die Kassette wurde zwar zusammengeklappt, aber nicht verschlossen für 10 min bei 37 °C inkubiert, um eine Erwärmung der Membran zu gewährleisten. Dann wurde die Kassette verschlossen und für 30 min bei RT gelagert. Nach dieser Inkubation war die Lichtemission ausreichend, dass ein Röntgenfilm belichtet werden konnte.

Belichtung und Entwicklung der Röntgenfilme

Materialien und Geräte

Kodak GBX Fixer and Developer Twin Set

5X Kodak Entwickler-Konzentrat

5X Kodak Fixierer-Konzentrat

daraus herzustellen:

Entwicklerlösung [5X Entwickler-Konzentrats 1:5 verdünnt in
Reinstwasser]

Fixierlösung [5X Fixierer-Konzentrats 1:5 verdünnt in
Reinstwasser]

Kodak-Biomax-MR-Film, Cat. No. 895 2855, Kodak

Leitungswasser

Reinstwasser

Rotlichtlampe

3 Entwicklerwannen zum Inkubieren der Filme in den Lösungen

Föhn

Durchführung

In einem dunklen Raum wurde auf die mit Haushaltsfolie bedeckte Membran bei Rotlichtbeleuchtung ein Röntgenfilm gelegt, der je nach Lichtinten-

sität der Proben nach 10 bis 25 min belichtet war und entwickelt werden konnte. Zur Vorbereitung wurden dann drei nebeneinander stehende Entwicklerwannen mit Entwicklerlösung, Leitungswasser und Fixierlösung gefüllt. Für die Entwicklung wurde der Film im Dunkeln aus der Kassette entnommen und nacheinander für 3 min in Entwicklerlösung, dann 1 min im Leitungswasser und 1 min in der Fixierlösung vorsichtig hin- und hergeschwenkt. Im Hellen wurde der Film mit destilliertem Wasser abgespült und trocken geföhnt.

Hybridisierung

① Die DIG-markierte DNA wird mit den auf der Nylonmembran fixierten Nukleinsäuren über Nacht bei 42 °C (Sonden aus unsubtrahierter cDNA) bzw. 55 °C (Sonden aus subtrahierter cDNA) hybridisiert. Die cDNA-Fragmente in den subtrahierten Proben sind durch die während der SSH erfolgten PCR-Schritte so angereichert, dass die spezifischere Hybridisierung bei 55 °C noch aussagekräftige Dot Blots erkennen lässt. Ob man für das Screening die Sonde aus subtrahierter oder unsubtrahierter cDNA herstellt, hat jeweils die in Tabelle 3.27 dargestellten Vor- und Nachteile.

Tabelle 3.27: Vor- und Nachteile der Sonden aus unsubtrahierter bzw. subtrahierter cDNA.

	als Sonde eingesetzt	Nachteil
I	unsubtrahierte cDNA: sensitiv und resistent	nur für stark exprimierte Sequenzen (> 0,2 % der Gesamt-cDNA)
II	subtrahierte cDNA: res - sens und sens - res	stärkeres Auftreten falsch-positiver Signale als beim Screening mit unsubtrahierter cDNA

Materialien und Geräte

DIG Easy Hyb-Lösung

DIG-markierte DNA

Eis

Schüttler, auf 42 °C bzw. 55 °C vorgeheizt

Thermocycler

Wasserbad, auf 68 °C vorgeheizt

Durchführung

Bei erstmaliger Verwendung der Sonde:

Die Membranen wurden in Hybridisierungsröhrchen in vorgewärmter *DIG Easy Hyb*-Lösung bei der Hybridisierungstemperatur (42 °C bzw. 55 °C) 30 min bei 100 rpm vorinkubiert. In dieser Zeit wurde die DIG-markierte DNA beider Proben durch 5-minütiges Erhitzen auf 95 °C im Thermocycler und schnelles Abkühlen auf Eis denaturiert. Nach der Vorinkubation der Membranen wurden die **Sondenlösungen** durch Zugabe der denaturierten DIG-markierten DNA in die *DIG Easy Hyb*-Lösung hergestellt.

Bei erneuter Verwendung einer Sondenlösung:

Die Membranen wurden in Hybridisierungsröhrchen in vorgewärmter *DIG Easy Hyb*-Lösung bei der Hybridisierungstemperatur (42 °C bzw. 55 °C) 30 min bei 100 rpm vorinkubiert. In dieser Zeit wurden die Sondenlösungen durch Erhitzen für 10 min bei 68 °C denaturiert. Die Vorinkubationslösung wurde anschließend durch die Sondenlösung ersetzt.

Für die Hybridisierung wurde die Membran über Nacht bei 42 °C (Sonden aus unsubtrahierter DNA) bzw. 55 °C (Sonden aus subtrahierter DNA) bei 100 rpm geschüttelt. Um die Sondenlösung wieder zu verwenden, wurde diese nach der Hybridisierung entfernt und bei -20 °C gelagert. Die Sonden wurden für alle durchgeführten Blots wieder verwendet.

Stringentes Waschen

① *Nach Entfernen der Sonde und während des stringenten Waschens darf die Membran nicht austrocknen. Ungewünschte Hybride nach der Hybridisierung werden durch zwei verschieden stringente Waschschrte gelöst. Der erste, geringer stringente Waschschrte mit einem Puffer mit hoher Salzkonzentration bei niedriger Temperatur entfernt unspezifisch gebundene Sonde. Der zweite, stärker stringente Waschschrte mit einem Puffer mit niedrigerer Salzkonzentration und hoher Temperatur denaturiert ungewünschte Hybride geringer Homologie. Wie die Ergebnisse der Dot-Blots zu werten sind, ist in Tabelle 3.28 dargestellt.*

Tabelle 3.28: Auswertungsschema für die Dot-Blot-Ergebnisse. Dabei waren Res2 und Sens2 die Sonden der subtrahierten cDNA und Res1 und Sens1 die Sonden der unsubtrahierten cDNA.

Sonde				Interpretation
Res2	Sens2	Res1	Sens1	
+	-	+	-	Meist (95 %) differentiell exprimierte Gene.
+	-	-	-	Typischerweise differentiell exprimierte <i>low-abundance</i> Gene, die aber auch falsch positiv sein können (Typ I-Hintergrund).
+	-	+	+	Schwer zu interpretierendes Ergebnis, meist sind es Sequenzen, die nur artifiziell während der SSH amplifiziert wurden.
++	+	+	-	Es handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um differentiell exprimierte Sequenzen.
+	+	+	+	Nicht differentiell exprimierte Sequenzen.
-	-	-	-	nicht differentiell exprimiert, liegt wahrscheinlich als einzelne Kopie nach der SSH vor, die dennoch von einem Vektor beim Klonieren aufgenommen worden ist und somit in die cDNA-Bank gelangt ist.

Benötigte Lösungen

Hoch-stringente Waschlösung, im Wasserbad auf 68 °C vorgewärmt

Mittel-stringende Waschlösung, im Wasserbad auf 65 °C vorgewärmt

Niedrig-stringente Waschlösung, im Wasserbad auf 65 °C vorgewärmt

DIG Wash and Block Buffer Set

1X Blockierungslösung

1X Waschbuffer

1X Detektionspuffer

Antikörperlösung

CSPD-Lösung, gebrauchsfertig

Durchführung

Das stringente Waschen wurden bei leichtem Schütteln (100 rpm) im Hybridisierungsröhrchen durchgeführt: Die Membran wurde zweimal 5 min bei RT mit niedrigstringenter Waschlösung gewaschen. Beim zweiten Waschschrift wurden für die subtrahierte Probe stringenter Bedingungen als für die unsubtrahierte gewählt: die subtrahierte Probe wurde zweimal 15 min mit hochstringenter Waschlösung bei 68 °C gewaschen, die unsubtrahierte Probe zweimal 15 min mit mittelstringenter Waschlösung bei

65 °C. Um Reste der Lösungen zu entfernen, wurde die Membran anschließend zuerst für 5 min bei RT mit Waschpuffer gewaschen.

Nach dem stringenten Waschen wurde die Membran, wie ab Seite 126 beschrieben, immunologisch detektiert und die Lichtemmission auf Röntgenfilmen, wie auf Seite 128 beschrieben, erfasst.

Entfernen der Sonde

① *Nach der Hybridisierung kann die DIG-markierte Sonde aus den Hybridbindungen wieder entfernt werden, und die Blots können mit einer anderen Sonde erneut hybridisiert werden. Dabei ist zu beachten, dass die Membranen nie austrocknen, bevor die Sonde wieder entfernt wird. Man nutzt dabei aus, dass die Hybridisierungen der Sonden an die geblotteten Sequenzen durch NaOH gelöst werden können. Die Membran kann nach dem Entfernen der Sonde bis zur nächsten Hybridisierung in Maleinsäurepuffer aufbewahrt werden.*

Materialien und Geräte

Strip-Lösung

2X SSC

herzustellen durch 1:10 Verdünnung von 20X SSC mit Reinstwasser

2X Maleinsäurepuffer

Durchführung

Um die Sonde von der Membran zu entfernen, wurde diese 1 min bei RT mit Wasser gewaschen. Im Hybridisierungsröhrchen wurde die Membran zweimal 15 min mit Strip-Lösung bei 37 °C und 100 rpm geschüttelt. Nach 5minütigem Waschen mit 2X SSC bei 100 rpm und RT wurde die Membran in 2X Maleinsäurepuffer gelagert.

3.10.5 Sequenzierung und Identifizierung differentiell exprimierter Fragmente

Um die nun identifizierten differentiell exprimierten Fragmente sequenzieren zu können, war eine erneute Amplifikation nötig, da die bisher verwendeten NP2Rs-Primer sowohl als rechter als auch als linker Primer agieren und somit eine Sequenzierung nicht möglich ist. Daher wurden die entsprechenden Inserts aus den E. coli-Lysaten erneut mittels PCR amplifiziert, jedoch unter Verwendung von M13-Primerpärchens, das nur eine Primerbindungsstelle pro Primer aufweist.

Die PCR wurde unter den gleichen Bedingungen wie die in Kapitel 3.10.3 beschriebene PCR zum Vereinzeln der PCR-Produkte durchgeführt. Anstatt 0,7 µl der NP2Rs-Primer wurden jedoch je 0,5 µl des M13-*forward*- bzw. des M13-*reverse*-Primers eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden, wie in Kapitel 3.7.6 beschrieben, gefällt, in 10 µl Ampuwa aufgenommen und in jeweils ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Platte wurde versiegelt und zum Sequenzieren der DNA mittels M13-Primern an die Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg, geschickt.

Die erhaltenen Sequenzierergebnisse konnten mittels einer Nukleotid-Nukleotid-Blast-Suche (*basic local alignment search tool*) identifiziert werden.¹⁰¹

3.11 Untersuchung der Genexpression an 18 Zelllinien

3.11.1 Cisplatin-Resistenzgrad aller untersuchten Zelllinien

Um die unterschiedlichen Zelllinien mit in der Wirkung vergleichbaren Cisplatin-Konzentrationen zu behandeln, wurde zuerst die EC_{50} jeder Zelllinie mittels MTT-Test, wie in 3.3 beschrieben, ermittelt. Der MTT-Test für jede Zelllinie wurde mit mindestens $n = 3$ mit je 3 Replikaten durchgeführt. Die ermittelten Absorptionen für die jeweiligen Kontrollen eines jeden Experimentes wurden im Durchschnitt gleich 100 % gesetzt und die Absorption jedes Wells darauf bezogen dargestellt. Nach diesem Normalisieren wurden die Daten der verschiedenen Wiederholungen zusammengefasst und in Prism durch nicht-lineare Kurvenregression ausgewertet.

3.11.2 Probengewinnung

Jede Zelllinie wurde in zwei T25-Zellkulturschalen ausgesät, und nach dem Anwachsen der Zellen über Nacht wurde das Nährmedium ausgetauscht. Die Kontrollprobe wurde mit Cisplatin-freiem Nährmedium behandelt, dem Nährmedium der anderen Probe wurde etwa die 2fach EC_{50} an Cisplatin zugesetzt. Nach 24 h wurde in beiden Proben das Nährmedium gewechselt und nach einer Auswaschphase von 48 h wurde die Gesamt-RNA, wie in 3.7.2 beschrieben, isoliert. Die isolierte Gesamt-RNA wurde, wie in 3.7.4 beschrieben, mittels UV quantifiziert und, wie in 3.8.1 beschrieben, in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde 1:10 mit 1X TE-Puffer pH 7,5 verdünnt und so als Template für die folgenden PCR-Reaktionen eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden, wie in 3.8.4 beschrieben, durchgeführt. In einem ersten Teilversuch wurden beide Proben einer Zelllinie (behandelt / unbehandelt) mit den neun potentiellen HKGs amplifiziert (siehe 3.8.5). Daraus wurden wie folgt beschrieben für jede Zelllinie drei HKGs ermittelt, und diese wurden in einem zweiten Teilversuch zusammen mit den neun GOI amplifiziert.

3.11.3 geNorm-Auswertung der qRT-PCR

Ermittlung der Housekeeping-Gene mittels geNorm

geNorm ist ein frei erhältliches Normalisierungsprogramm (nach Registrierung) für RT-PCR-Untersuchungen. Es basiert auf der Idee von J. Vandesompele. Um mit Hilfe von geNorm die HKGs einer Zelllinie zu ermitteln, mussten die C_T -Werte jedes HKG in jeder Zelllinie zuerst in so genannte Quantities umgerechnet werden. Wie dies genau geht, ist im Folgenden am Beispiel der beiden Cal27-Zelllinien gezeigt, die jeweils einmal ohne Cisplatin (-) und einmal mit Cisplatin (+) kultiviert wurden. Dabei wurde die Genexpression von sieben möglichen HKGs untersucht (normalerweise wurden neun HKGs untersucht, aus vorhergegangenen Läufen war jedoch bekannt, dass B2M und UBE2D2 nicht als HKGs in Frage kommen). Die C_T -Werte sind in Tabelle 3.29 wiedergegeben.

Tabelle 3.29: Mittelwerte der C_T -Werte von sieben HKG in vier Cal27-Proben.

	ACTB	HPRT1	RPLP0	GUSB	TFR	RPL13	PhosA2
Cal27 -	22,29	25,41	24,84	28,72	25,51	25,09	22,91
Cal27 +	21,99	25,12	25,87	29,69	25,78	26,82	23,65
Cal27res -	21,72	25,10	25,64	29,55	25,65	26,12	23,99
Cal27res +	21,92	25,15	25,57	29,50	25,86	26,09	23,95

Die Quantities (Q), die die Verhältnisse der Genexpression eines Genes über die untersuchten Proben wiedergeben, wurden aus den C_T -Werten mit Hilfe der ΔC_T -Methode nach Gleichung 3.8 ermittelt. Die Standardabweichungen der Quantities ($SD Q$), die bei der Berechnung der Expressionsfaktoren benötigt wurden, wurden nach Gleichung 3.9 berechnet.

$$Q = 2^{(CT_{\min} - CT(Probe))} \quad \text{Gleichung 3.8}$$

$$SD Q = Q \cdot \ln 2 \cdot SD_{CT(Probe)} \quad \text{Gleichung 3.9}$$

Nach Gleichung 3.8 errechnete Quantities für alle potentiellen HKG sind in Tabelle 3.30 dargestellt.

Tabelle 3.30: Quantities für die sieben HKG über vier Cal27-Proben.

Q	ACTB	HPRT1	RPLP0	GU	TFR	RPL13	PhosA2
Cal27 -	0,671	0,805	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Cal27 +	0,826	0,985	0,490	0,511	0,829	0,302	0,601
Cal27res -	1,000	1,000	0,577	0,563	0,903	0,490	0,476
Cal27res +	0,871	0,965	0,606	0,581	0,781	0,502	0,487

Diese Quantities wurden in das Excel-Arbeitsblatt geNorm eingegeben, das daraus für die untersuchten Proben die stabilsten HKGs bestimmte. Dazu vergleicht geNorm die Expression eines Gens über alle Proben mit Hilfe der M-Werte, die für alle Gene in Tabelle 3.31 angegeben sind.

Tabelle 3.31: Schrittweise Reduktion der potentiellen HKG aufgrund des mit geNorm ermittelten M-Wertes. Der kleinste M-Wert jedes Analyseschrittes ist fett gedruckt und grau hinterlegt, der größte fett gedruckt.

M-Werte	ACTB	HPRT1	RPLP0	GU	TFR	RPL13	PhosA2
1. Analyse	0,561	0,508	0,366	0,361	0,381	0,575	0,464
2. Analyse	0,497	0,441	0,381	0,368	0,337	-	0,455
3. Analyse	-	0,521	0,315	0,298	0,334	-	0,386
4. Analyse	-	-	0,225	0,203	0,352	-	0,303
5. Analyse	-	-	0,168	0,142	-	-	0,258

Der M-Wert ist ein Maß dafür, wie stabil das entsprechende Gen über alle Proben exprimiert wird. Je kleiner dessen Wert, desto stabiler ist die Expression. Der M-Wert errechnet sich aus der durchschnittlichen paarweisen Abweichung eines HKG zu allen anderen HKGs innerhalb einer Probe.⁸²

In einer ersten Analyse wird das Gen der sieben potentiellen HKGs bestimmt, das den größten M-Wert aufweist, also am wenigsten stabil über alle Proben exprimiert wird. Es wird aus dem Datenblatt eliminiert und für

die verbleibenden sechs potentiellen HKG wird in einer zweiten Analyse wiederum das am wenigsten stabile Gen bestimmt usw. Auf diese Weise kommt es zu einer Reduktion auf die drei besten HKG in den untersuchten vier Proben: GUSB, RPLP0 und PhosA2. Die Gene mit dem größten M-Wert pro Analyse sind in Tabelle 3.31 fett gedruckt dargestellt, die mit dem kleinsten M-Wert fett und grau unterlegt.

Berechnung der GOI-Expressionsfaktoren mittels geNorm

Die Berechnung des Expressionsfaktors eines GOI zwischen Cisplatin-behandelten und -unbehandelten Cal27-Proben soll hier beispielhaft dargestellt werden. Dazu wurde aus den C_T -Werten der drei HKG für jede Probe zuerst ein Normalisierungsfaktor errechnet. Dazu wurden pro Gen die Mittelwerte der gemessenen C_T -Werte (MW C_T) wie zuvor beschrieben (siehe Gleichung 3.8) in Quantities (Q) mit entsprechenden Standardabweichungen (SD Q) nach Gleichung 3.9 umgerechnet (siehe Tabelle 3.32).

Tabelle 3.32: C_T -Werte und Quantities der HKGs für Cal27– und Cal 27+.

HKG	Probe	MW C_T	SD C_T	Q	SD Q
RPLP0	Cal27 -	25,75	0,27	1,000	0,187
RPLP0	Cal27 +	26,70	0,18	0,517	0,066
GUSB	Cal27 -	30,29	0,10	1,000	0,066
GUSB	Cal27 +	31,55	0,98	0,417	0,284
PhosA2	Cal27 -	25,47	0,20	1,000	0,137
PhosA2	Cal27 +	26,31	0,06	0,556	0,024

Über die Quantities kann für jede Probe ein Normalisierungsfaktor (NF) nach Gleichung 3.10 mit entsprechender relativer Standardabweichung (SD NF) nach Gleichung 3.11 berechnet werden (siehe Tabelle 3.33). Der NF ist das geometrische Mittel der Quantities der drei HKG.

$$NF = \sqrt[3]{Q_{HKG_1} \times Q_{HKG_2} \times Q_{HKG_3}}$$

Gleichung 3.10

$$SD\ NF = NF \times \sqrt{\left(\sqrt{\frac{SD\ Q\ HKG_1}{3 \times Q\ HKG_1}}\right)^2 + \left(\sqrt{\frac{SD\ Q\ HKG_2}{3 \times Q\ HKG_2}}\right)^2 + \left(\sqrt{\frac{SD\ Q\ HKG_3}{3 \times Q\ HKG_3}}\right)^2}$$

Gleichung 3.11**Tabelle 3.33: Normalisierungsfaktoren mit Standardabweichungen für beide Cal27-Proben.**

	NF	SD NF
Cal27 -	1,000	1,002
Cal27 +	0,493	0,114

Ebenso wie die C_T -Werte der HKG wurden die C_T -Werte der GOI in Quantities umgerechnet. Diese sind in Tabelle 3.34 beispielhaft für das GOI DKK1 dargestellt.

Tabelle 3.34: Berechnung der Quantities am Beispiel der C_T -Werte von DKK1 in Cal27 - und Cal27 +.

DKK1	MW CT	SD CT	Q_{GOI}	SD Q_{GOI}
Cal27 -	29,87	0,60	0,180	0,074
Cal27 +	27,40	0,10	1,000	0,070

Nun konnte die Genexpression von DKK1 in beiden Proben über die Normalisierungsfaktoren berechnet werden, indem die Quantities der GOI durch die Normalisierungsfaktoren dividiert wurden (siehe Gleichung 3.12). Der Standardabweichung der normalisierten Expressionslevel ($SD\ GOI_{norm}$) wurde entsprechend dem Fehlerfortpflanzungsgesetz nach Gleichung 3.13 berechnet.

$$GOI_{norm} = \frac{Q_{GOI}}{NF}$$

Gleichung 3.12

$$SD\ GOI_{norm} = GOI_{norm} \times \sqrt{\left(\frac{SD\ NF}{NF}\right)^2 + \left(\frac{SD\ Q_{GOI}}{Q_{GOI}}\right)^2} \quad \text{Gleichung 3.13}$$

Um die normalisierten Expressionslevel besser zu verstehen, wurden sie zu *Fold-Change*-Werten (FC) reskaliert, indem beide GOI_{norm} -Werte durch den kleineren GOI_{norm} -Wert geteilt wurden. Die Standardabweichung des reskalierten FC (SD) ist dementsprechend (geteilt durch 0,180) mit umgerechnet worden. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 3.35 dargestellt.

Tabelle 3.35: Berechnung der normalisierten Expressionslevel und Reskalierung.

DKK1	normalisierte Expressionslevel			Reskalierung	
	GOI_{norm}	SD		FC GOI_{norm}	SD FC GOI_{norm}
Cal27 -	0,180	0,076	alles geteilt	1,00	0,422
Cal27 +	2,027	0,490	durch 0,180	11,26	2,722

Nun ergibt sich der Expressionsfaktor EF aus dem Verhältnis der reskalierten Expressionslevel (siehe Gleichung 3.14) und dessen Fehler SD EF nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz aus der Wurzel der Fehlerquadratsummen nach Gleichung 3.15.

$$EF = \frac{GOInorm(+)}{GOInorm(-)} \quad \text{Gleichung 3.14}$$

$$SD\ EF = EF \times \sqrt{\left(\frac{SD\ GOInorm(-)}{GOInorm(-)}\right)^2 + \left(\frac{SD\ GOInorm(+)}{GOInorm(+)}\right)^2} \quad \text{Gleichung 3.15}$$

So ergibt sich für die mit Cisplatin behandelte Probe Cal27+ eine $11,26 \pm 5,51$ fache Überexpression von DKK1 im Vergleich zu der unbehandelten Probe Cal27-.

3.11.4 NormIt-Auswertung der qRT-PCR

NormIt ist ein im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes weiteres Normierungsverfahren, das es erlaubt, die Genexpression von verschiedensten Proben miteinander zu vergleichen.

In Tabelle 3.36 sind die C_T -Werte der potentiellen HKGs über die 36 Proben der 18 Zelllinien in unbehandelten (-) und behandeltem Zustand (+) dargestellt. Zuerst wird für jedes HKG über alle Proben der Mittelwert berechnet (MW Proben, letzte Zeile der Tabelle 3.36). Der nächste Schritt ist dann, die C_T -Werte ins Verhältnis mit dem entsprechenden MW Proben zu setzen, dies ist in Tabelle 3.37 dargestellt.

Tabelle 3.36: C_T -Werte der potentiellen HKGs.

	ACTB	RPLP0	RPL13	PhosA2	UB	B2M	HPRT1	TFR	GUSB
1321 -	13,87	15,30	15,61	16,87	19,06	17,79	20,74	20,30	21,24
1321 +	15,81	16,26	16,12	18,07	19,31	18,24	21,66	20,51	21,23
1539 -	20,06	24,18	25,92	21,55	22,83	24,44	24,94	27,35	26,84
1539 +	21,39	25,03	25,88	22,67	23,55	24,43	26,45	28,20	27,70
2102 -	14,94	15,37	15,47	18,28	18,28	18,87	19,54	21,04	20,46
2102 +	14,89	16,08	16,05	18,54	18,78	18,64	20,53	22,47	20,42
2102KLE -	22,18	17,21	22,16	22,36	21,92	26,40	24,89	26,76	26,13
2102KLE +	21,15	18,90	22,57	22,30	22,58	25,86	26,15	27,65	26,73
A2780 -	16,40	16,46	15,37	18,83	18,74	16,27	21,00	27,44	22,33
A2780 +	16,52	17,10	16,23	20,06	20,42	16,81	21,76	25,03	23,66
A2780cis -	15,18	15,66	14,75	18,24	21,96	17,18	19,53	22,42	19,30
A2780cis +	16,54	16,36	15,32	20,12	22,54	17,90	22,27	24,70	20,63
Caco2 -	14,33	14,60	14,95	17,68	17,67	17,77	19,54	19,95	20,28
Caco2 +	14,48	14,98	15,63	18,36	18,22	17,48	20,53	21,17	20,41
Cal27res -	21,72	25,64	26,12	23,99	25,26	25,48	25,10	25,65	29,55
Cal27res +	21,92	25,57	26,09	23,95	24,25	23,89	25,15	25,86	29,50
Cal27 -	22,29	24,84	25,09	22,91	26,74	25,36	25,41	25,51	28,72
Cal27 +	21,99	25,87	26,82	23,65	28,82	25,46	25,12	25,78	29,69
DU145 -	22,36	18,63	25,46	23,29	22,68	25,63	24,31	26,42	28,81
DU145 +	22,16	18,77	22,63	23,74	21,83	24,59	25,29	26,15	27,88
Hek293 -	16,65	14,81	15,39	19,13	21,49	21,46	20,80	26,62	21,46
Hek293 +	17,07	14,90	16,00	19,76	21,52	20,69	20,85	26,46	22,00
HepG2 -	15,51	15,18	15,42	20,20	20,19	23,65	21,75	22,14	22,48
HepG2 +	17,29	16,87	17,18	21,32	21,10	23,41	23,17	23,10	23,03
HT29 -	16,94	15,80	15,74	19,55	20,23	21,30	21,78	21,28	23,65
HT29 +	16,16	16,23	16,52	18,76	19,11	18,54	20,62	20,71	22,24
K562 -	17,32	15,53	16,10	19,13	20,04	19,85	20,29	20,57	21,96
K562 +	18,76	17,11	17,83	20,59	21,20	20,39	21,93	21,17	22,30
Kyse510 -	22,20	26,25	24,05	24,22	22,72	26,01	26,60	26,01	29,89
Kyse510 +	21,15	26,24	24,60	23,51	22,49	26,01	25,47	25,26	29,81
MCF7 -	16,80	16,75	16,15	18,25	19,70	16,55	20,48	20,46	22,91
MCF7 +	16,66	17,45	16,52	18,44	20,51	17,26	22,36	21,69	23,84
T24 -	20,23	16,88	23,71	24,63	23,07	26,12	24,32	29,91	26,91
T24 +	20,24	16,53	24,04	24,13	21,88	25,04	23,25	28,20	25,74
U937 -	20,92	16,62	20,62	24,36	22,72	24,77	24,14	27,16	25,19
U937 +	18,41	17,57	16,77	22,64	22,74	22,53	24,13	26,72	22,98
MW Proben	18,40	18,43	19,47	20,95	21,56	21,72	22,83	24,38	24,39

Errechnet man nun den Mittelwert (MW HKG) über die soeben errechneten Verhältnisse einer Probe (siehe Tabelle 3.37), kann man erkennen, dass manche Proben über alle HKGs deutlich kleinere C_T -Werte aufweisen als der Durchschnitt aller Proben (zu erkennen an den Verhältnissen kleiner 1, z. B. 1321 -), andere deutlich größere C_T -Werte als der Durchschnitt wie z. B. Cal27 +. Wären alle untersuchten Gene in einer Probe ideale HKGs, wären die Verhältnisse für alle Gene einer Probe identisch.

Tabelle 3.37: Verhältnisse der C_T -Werte zu den entsprechenden MW Proben. Über die Verhältnisse aller Gene einer Probe lässt sich der MW Verhältnis HKG bilden, von dem das 75–125%-Intervall der Iteration angegeben ist.

	Verhältnis der Gene zum MW Proben									MW Verhält- nis HKG	Max 125%	Min 75%
	ACTB	Hupo	RPL13	PhosA2	UB	B2M	HPRT1	TFR	GUSB			
1321 -	0,75	0,83	0,80	0,81	0,88	0,82	0,91	0,83	0,87	0,83	1,04	0,67
1321 +	0,86	0,88	0,83	0,86	0,90	0,84	0,95	0,84	0,87	0,87	1,09	0,70
1539 -	1,09	1,31	1,33	1,03	1,06	1,12	1,09	1,12	1,10	1,14	1,43	0,91
1539 +	1,16	1,36	1,33	1,08	1,09	1,12	1,16	1,16	1,14	1,18	1,47	0,94
2102 -	0,81	0,83	0,79	0,87	0,85	0,87	0,86	0,86	0,84	0,84	1,05	0,67
2102 +	0,81	0,87	0,82	0,88	0,87	0,86	0,90	0,92	0,84	0,86	1,08	0,69
2102KLE -	1,21	0,93	1,14	1,07	1,02	1,22	1,09	1,10	1,07	1,09	1,37	0,87
2102KLE +	1,15	1,03	1,16	1,06	1,05	1,19	1,15	1,13	1,10	1,11	1,39	0,89
A2780 -	0,89	0,89	0,79	0,90	0,87	0,75	0,92	1,13	0,92	0,89	1,12	0,72
A2780 +	0,90	0,93	0,83	0,96	0,95	0,77	0,95	1,03	0,97	0,92	1,15	0,74
A2780cis -	0,82	0,85	0,76	0,87	1,02	0,79	0,86	0,92	0,79	0,85	1,07	0,68
A2780cis +	0,90	0,89	0,79	0,96	1,05	0,82	0,98	1,01	0,85	0,92	1,14	0,73
Caco2 -	0,78	0,79	0,77	0,84	0,82	0,82	0,86	0,82	0,83	0,81	1,02	0,65
Caco2 +	0,79	0,81	0,80	0,88	0,84	0,80	0,90	0,87	0,84	0,84	1,05	0,67
Cal27res -	1,18	1,39	1,34	1,15	1,17	1,17	1,10	1,05	1,21	1,20	1,50	0,96
Cal27res +	1,19	1,39	1,34	1,14	1,12	1,10	1,10	1,06	1,21	1,18	1,48	0,95
Cal27 -	1,21	1,35	1,29	1,09	1,24	1,17	1,11	1,05	1,18	1,19	1,48	0,95
Cal27 +	1,20	1,40	1,38	1,13	1,34	1,17	1,10	1,06	1,22	1,22	1,53	0,98
DU145 -	1,21	1,01	1,31	1,11	1,05	1,18	1,06	1,08	1,18	1,13	1,42	0,91
DU145 +	1,20	1,02	1,16	1,13	1,01	1,13	1,11	1,07	1,14	1,11	1,39	0,89
Hek293 -	0,90	0,80	0,79	0,91	1,00	0,99	0,91	1,09	0,88	0,92	1,15	0,74
Hek293 +	0,93	0,81	0,82	0,94	1,00	0,95	0,91	1,09	0,90	0,93	1,16	0,74
HepG2 -	0,84	0,82	0,79	0,96	0,94	1,09	0,95	0,91	0,92	0,91	1,14	0,73
HepG2 +	0,94	0,92	0,88	1,02	0,98	1,08	1,02	0,95	0,94	0,97	1,21	0,77
HT29 -	0,92	0,86	0,81	0,93	0,94	0,98	0,95	0,87	0,97	0,91	1,14	0,73
HT29 +	0,88	0,88	0,85	0,90	0,89	0,85	0,90	0,85	0,91	0,88	1,10	0,70
K562 -	0,94	0,84	0,83	0,91	0,93	0,91	0,89	0,84	0,90	0,89	1,11	0,71
K562 +	1,02	0,93	0,92	0,98	0,98	0,94	0,96	0,87	0,91	0,95	1,18	0,76
Kyse510 -	1,21	1,42	1,24	1,16	1,05	1,20	1,17	1,07	1,23	1,19	1,49	0,95
Kyse510 +	1,15	1,42	1,26	1,12	1,04	1,20	1,12	1,04	1,22	1,17	1,47	0,94
MCF7 -	0,91	0,91	0,83	0,87	0,91	0,76	0,90	0,84	0,94	0,87	1,09	0,70
MCF7 +	0,91	0,95	0,85	0,88	0,95	0,79	0,98	0,89	0,98	0,91	1,14	0,73
T24 -	1,10	0,92	1,22	1,18	1,07	1,20	1,07	1,23	1,10	1,12	1,40	0,90
T24 +	1,10	0,90	1,23	1,15	1,01	1,15	1,02	1,16	1,06	1,09	1,36	0,87
U937 -	1,14	0,90	1,06	1,16	1,05	1,14	1,06	1,11	1,03	1,07	1,34	0,86
U937 +	1,00	0,95	0,86	1,08	1,05	1,04	1,06	1,10	0,94	1,01	1,26	0,81

Da aber nicht alle Gene in allen Proben HKGs sind, müssen diese erkannt und eliminiert werden. Nicht ideale HKGs sind daran zu erkennen, dass ihr Verhältnis vom Durchschnitt der Verhältnisse (MW Verhältnis HKG, auch allgemeines Expressionsprofil) über eine Probe abweicht. Wenn man, wie in Tabelle 3.37 gezeigt, einen Bereich um den Mittelwert der Verhältnisse einer Probe definiert ($MW \pm X \%$) und X immer weiter bis auf 25 % minimiert, zeigt sich, dass TFR in A2780 – mit 1,13 nicht mehr in dem Bereich von $0,89 \pm 25 \%$ ($0,72 - 1,12$) liegt (in Tabelle 3.37 fett gedruckt und grau hinterlegt).

Damit ist TFR über alle Gene das schlechteste HKG in A2780, da alle anderen Gene noch im Bereich $MW \pm 25 \%$ ihrer Probe liegen. Daher wird TFR in A2780 – aus der Datenmatrix eliminiert. Als Folge wird ein neuer MW Proben für TFR berechnet und die Verhältnisse von TFR werden ebenfalls neu berechnet. In der nun erhaltenen Datenmatrix liegen alle Verhältnisse im Bereich $\pm 25 \%$ um den Mittelwert, also kann der Bereich weiter minimiert werden. Bei 21,5 % zeigt sich, dass RPLP0 in T24 – mit 0,92 nicht im Bereich von $1,12 \pm 21,5 \%$ ($0,922 - 1,361$) liegt und wird daraufhin ebenfalls aus der Datenmatrix eliminiert, usw. (siehe Tabelle 3.37, ebenfalls fett gedruckt und grau hinterlegt).

Bei einem Bereich von 4,68 % um den MW HKG tritt der Fall ein, dass in der Probe A2780cis + das drittletzte Gen eliminiert werden müsste (siehe Tabelle 3.38, fett gedruckt und grau hinterlegt). An diesem Punkt wird die Iteration gestoppt, da die Normalisierung einer Probe auf mindestens drei HKGs beruhen sollte.

Tabelle 3.38: Datenmatrix zum Ende der Iteration. Als nächstes müsste HPRT1 in A2780cis + (fett gedruckt und grau hinterlegt) eliminiert werden, es ist aber das drittletzte Gen für diese Probe, daher wird die Iteration gestoppt.

	Verhältnis der Gene zum MW Proben									MW Verhält- nis HKG	Max 104,7 %	Min 95,3 %
	ACTB	Hupo	RPL13	PhosA2	UB	B2M	HPRT1	TFR	GUSB			
1321 -		0,83	0,80	0,81		0,82		0,83	0,87	0,84	0,87	0,80
1321 +	0,86	0,88	0,83	0,86	0,90	0,84		0,84	0,87	0,87	0,91	0,83
1539 -	1,09				1,06	1,12	1,09	1,12	1,10	1,10	1,15	1,05
1539 +	1,16				1,09	1,12	1,16	1,16	1,14	1,14	1,19	1,09
2102 -		0,83		0,87	0,85	0,87	0,86	0,86	0,84	0,87	0,91	0,83
2102 +		0,87		0,88	0,87		0,90	0,92		0,91	0,95	0,87
2102KLE -				1,07			1,09	1,10	1,07	1,08	1,13	1,03
2102KLE +	1,15		1,16				1,15	1,13	1,10	1,13	1,18	1,08
A2780 -	0,89	0,89		0,90			0,92		0,92	0,92	0,96	0,88
A2780 +				0,96	0,95		0,95		0,97	0,97	1,01	0,92
A2780cis -				0,87			0,86	0,92		0,89	0,93	0,85
A2780cis +					1,05		0,98	1,01		1,02	1,07	0,98
Caco2 -				0,84	0,82	0,82	0,86	0,82	0,83	0,84	0,88	0,80
Caco2 +				0,88	0,84		0,90	0,87	0,84	0,87	0,92	0,84
Cal27res -	1,18			1,15	1,17	1,17			1,21	1,18	1,23	1,12
Cal27res +				1,14	1,12	1,10	1,10			1,12	1,17	1,07
Cal27 -				1,09		1,17	1,11		1,18	1,14	1,20	1,09
Cal27 +		1,40	1,38		1,34					1,39	1,45	1,33
DU145 -				1,11	1,05		1,06	1,08		1,09	1,14	1,04
DU145 +			1,16	1,13		1,13	1,11		1,14	1,13	1,18	1,08
Hek293 -	0,90			0,91			0,91		0,88	0,90	0,95	0,86
Hek293 +	0,93			0,94		0,95	0,91		0,90	0,93	0,97	0,89
HepG2 -				0,96	0,94		0,95	0,91	0,92	0,95	0,99	0,90
HepG2 +	0,94			1,02	0,98		1,02	0,95	0,94	0,98	1,03	0,94
HT29 -	0,92			0,93	0,94	0,98	0,95		0,97	0,95	0,99	0,91
HT29 +	0,88	0,88	0,85	0,90	0,89	0,85	0,90	0,85	0,91	0,88	0,93	0,84
K562 -	0,94			0,91	0,93	0,91	0,89		0,90	0,92	0,96	0,87
K562 +		0,93	0,92	0,98	0,98	0,94	0,96		0,91	0,95	1,00	0,91
Kyse510 -	1,21		1,24	1,16		1,20	1,17		1,23	1,19	1,24	1,14
Kyse510 +	1,15			1,12			1,12			1,13	1,18	1,08
MCF7 -	0,91	0,91			0,91		0,90		0,94	0,93	0,97	0,89
MCF7 +		0,95			0,95		0,98		0,98	0,98	1,03	0,94
T24 -	1,10				1,07		1,07		1,10	1,09	1,14	1,04
T24 +	1,10			1,15		1,15		1,16		1,14	1,20	1,09
U937 -			1,06		1,05		1,06		1,03	1,05	1,09	1,00
U937 +				1,08	1,05	1,04	1,06	1,10		1,07	1,12	1,02

Für jede Probe kann nun ein Normalisierungswert (NW) ausgerechnet werden, um alle Proben auf der Basis der ermittelten HKGs zu normalisieren. Der NW ist die Differenz aus MW HKG und dem Mittelwert aller MW Probe-Werte (21,23) und besagt, um welchen C_T -Wert die jeweilige Probe vom Durchschnitt aller Proben abweicht (siehe Tabelle 3.39).

Tabelle 3.39: Datenmatrix der C_T -Werte zum Ende der Iteration und Ermittlung des Normalisierungswertes (NW) für jede Probe.

	C_T -Werte									MW C_T HKG	NW
	ACTB	Hupo	RPL13	PhosA2	UB	B2M	HPRT1	TFR	GUSB		
1321 -		15,30	15,61	16,87		17,79		20,30	21,24	17,85	3,38
1321 +	15,81	16,26	16,12	18,07	19,31	18,24		20,51	21,23	18,19	3,04
1539 -	20,06				22,83	24,44	24,94	27,35	26,84	24,41	-3,18
1539 +	21,39				23,55	24,43	26,45	28,20	27,70	25,29	-4,05
2102 -		15,37		18,28	18,28	18,87	19,54	21,04	20,46	18,83	2,40
2102 +		16,08		18,54	18,78		20,53	22,47		19,28	1,95
2102KLE -		17,21		22,36			24,89	26,76	26,13	23,47	-2,24
2102KLE +	21,15		22,57				26,15	27,65	26,73	24,85	-3,61
A2780 -	16,40	16,46		18,83			21,00		22,33	19,01	2,23
A2780 +				20,06	20,42		21,76		23,66	21,47	-0,24
A2780cis -				18,24			19,53	22,42		20,06	1,17
A2780cis +					22,54		22,27	24,70		23,17	-1,94
Caco2 -				17,68	17,67	17,77	19,54	19,95	20,28	18,81	2,42
Caco2 +				18,36	18,22		20,53	21,17	20,41	19,74	1,50
Cal27res -	21,72			23,99	25,26	25,48			29,55	25,20	-3,97
Cal27res +				23,95	24,25	23,89	25,15			24,31	-3,08
Cal27 -				22,91		25,36	25,41		28,72	25,60	-4,37
Cal27 +		25,87	26,82		28,82					27,17	-5,94
DU145 -				23,29	22,68		24,31	26,42		24,17	-2,94
DU145 +			22,63	23,74		24,59	25,29		27,88	24,82	-3,59
Hek293 -	16,65			19,13			20,80		21,46	19,51	1,72
Hek293 +	17,07			19,76		20,69	20,85		22,00	20,07	1,16
HepG2 -				20,20	20,19		21,75	22,14	22,48	21,35	-0,12
HepG2 +	17,29			21,32	21,10		23,17	23,10	23,03	21,50	-0,27
HT29 -	16,94			19,55	20,23	21,30	21,78		23,65	20,57	0,66
HT29 +	16,16	16,23	16,52	18,76	19,11	18,54	20,62	20,71	22,24	18,77	2,47
K562 -	17,32			19,13	20,04	19,85	20,29		21,96	19,77	1,47
K562 +		17,11	17,83	20,59	21,20	20,39	21,93		22,30	20,19	1,04
Kyse510 -	22,20		24,05	24,22		26,01	26,60		29,89	25,49	-4,26
Kyse510 +	21,15			23,51			25,47			23,38	-2,15
MCF7 -	16,80	16,75			19,70		20,48		22,91	19,33	1,90
MCF7 +		17,45			20,51		22,36		23,84	21,04	0,20
T24 -	20,23				23,07		24,32		26,91	23,63	-2,40
T24 +	20,24			24,13		25,04		28,20		24,40	-3,17
U937 -			20,62		22,72		24,14		25,19	23,17	-1,94
U937 +				22,64	22,74	22,53	24,13	26,72		23,75	-2,52
MW Probe	18,74	17,28	20,31	20,67	21,38	21,96	22,77	23,88	24,11	21,23	

Mit diesen NW können nun alle gemessenen C_T -Werte der GOI durch Addition des NW normalisiert werden, so dass ein direkter Vergleich der normalisierten C_T -Werte möglich wird. Dies ist am Beispiel der drei GOIs AKR1B1, AKR1C1/2 und CSTA in Tabelle 3.40 dargestellt.

Tabelle 3.40: Normalisierung der C_T -Werte am Beispiel von drei GOIs. Proben, für die kein C_T -Wert gemessen wurde ($C_T > 40,0$), wurden nach der Normalisierung auf 37,00 gesetzt (kursiv dargestellt).

	C_T -Werte			NW	normalisierte C_T -Werte		
	AKR1B1	AKR1C1/2	CSTA		AKR1B1	AKR1C1/2	CSTA
1321 -	18,71	20,98	22,90	3,38	22,09	24,36	26,28
1321 +	19,27	18,91	22,39	3,04	22,31	21,95	25,43
1539 -	28,78	-	36,57	-3,18	25,61	37,00	33,40
1539 +	28,63	35,21	32,76	-4,05	24,58	31,15	28,71
2102 -	20,39	27,78	31,65	2,40	22,79	30,18	34,05
2102 +	20,32	29,34	25,54	1,95	22,27	31,29	27,50
2102KLE -	27,11	33,38	34,96	-2,24	24,88	31,14	32,72
2102KLE +	26,85	33,51	29,99	-3,61	23,24	29,89	26,38
A2780 -	20,14	27,39	26,95	2,23	22,37	29,62	29,18
A2780 +	21,26	27,12	25,53	-0,24	21,02	26,88	25,29
A2780cis -	19,55	22,86	27,44	1,17	20,72	24,04	28,61
A2780cis +	20,89	24,21	26,05	-1,94	18,95	22,27	24,11
Caco2 -	21,09	21,69	26,81	2,42	23,51	24,11	29,23
Caco2 +	21,51	21,70	27,48	1,50	23,00	23,20	28,98
Cal27res -	27,55	33,31	32,61	-3,97	23,58	29,34	28,64
Cal27res +	26,10	33,87	30,77	-3,08	23,03	30,79	27,70
Cal27 -	28,95	29,18	28,13	-4,37	24,58	24,81	23,76
Cal27 +	27,49	31,64	29,24	-5,94	21,55	25,70	23,31
DU145 -	29,73	35,36	-	-2,94	26,78	32,42	37,00
DU145 +	28,87	35,67	32,22	-3,59	25,28	32,08	28,63
Hek293 -	19,41	31,17	25,54	1,72	21,13	32,89	27,26
Hek293 +	19,62	29,30	23,58	1,16	20,78	30,46	24,74
HepG2 -	20,86	17,45	26,24	-0,12	20,74	17,33	26,12
HepG2 +	21,84	19,15	22,54	-0,27	21,57	18,88	22,27
HT29 -	30,82	26,36	29,49	0,66	31,48	27,02	30,15
HT29 +	28,23	25,92	29,56	2,47	30,70	28,39	32,03
K562 -	31,55	22,05	31,63	1,47	33,02	23,52	33,10
K562 +	29,59	23,58	32,71	1,04	30,63	24,63	33,75
Kyse510 -	26,84	27,30	25,97	-4,26	22,58	23,04	21,70
Kyse510 +	24,97	24,16	25,75	-2,15	22,82	22,01	23,60
MCF7 -	31,07	20,27	23,44	1,90	32,97	22,18	25,35
MCF7 +	26,30	24,16	23,33	0,20	26,50	24,36	23,52
T24 -	25,98	-	33,99	-2,40	23,58	37,00	31,60
T24 +	24,98	-	31,94	-3,17	21,81	37,00	28,77
U937 -	32,62	-	25,36	-1,94	30,68	37,00	23,43
U937 +	30,00	-	22,08	-2,52	27,49	37,00	19,56

Eine vollständige Angabe aller C_T -Werte ist in Kapitel 12.3.3 zu finden.

3.12 Überexpression von DKK1

3.12.1 Überblick

Der von der Firma Biocat, Heidelberg, bezogene cDNA-Klon OHS1770-9382161 enthielt die Sequenz von DKK1 im pDONR223-Vektor (trägt Spectinomycin-Resistenz) als DH5 α -E. coli-Kultur. Um einen Expressionsvektor für Säugetierzellen zu generieren, wurde diese Sequenz wie im Folgenden beschrieben in den pcDNA3.1(+)-Vektor (Vektorkarte siehe Kapitel 12.4.2) kloniert.

3.12.2 Bakterien-Stocks und Plasmidisolierung

Material und Methoden

cDNA-Klon OHS1770-9382161

Spectinomycin-Stammlösung

LB-Medium

Glycerol 60%ig

Gefrier-Röhrchen

Rapid Plasmid Miniprep Kit

Durchführung

Die E. coli wurden in 15 ml LB-Medium mit Zusatz von 50 μ g/ml Spectinomycin kultiviert. Drei Mal 900 μ l wurden mit je 300 μ l 60%igem Glycerol versetzt und bei -80 °C als so genannter Stock eingefroren. 10 ml der Suspensionskultur wurden bei 4 000 g pelletiert und der Überstand wurde dekantiert. Mit Hilfe des *Rapid Plasmid Miniprep Kit* wurden die Plasmide entsprechend dem Herstellerprotokoll isoliert.

3.12.3 Insert-Isolierung mittels *Proof Reading*-PCR

Kozak-Prinzip

① Die meisten mRNAs von Eukaryonten enthalten eine kurze Erkennungs-Sequenz, die die initiale Bindung der mRNA an die kleine Untereinheit des Ribosoms für die folgende Translation erleichtert. Kozak untersuchte 699 Vertebraten-mRNAs und analysierte die Sequenzen um das Start-Codon.¹⁰² Dabei erkannte sie, dass an der Position -3, bezogen auf das Startcodon, in 97 % der untersuchten Sequenzen ein Purin-Nukleosid, Adenin (61 %) bzw. Guanin (36 %), zu finden ist (siehe Abbildung 3.30). Cytosin kommt an dieser Position mit einer Wahrscheinlichkeit von 2 % und Thymin von 1 % vor, was deutlich von den statistisch zu erwartenden 25 % je Nukleosid abweicht. Ebenfalls auffällig war eine 44%ige Häufigkeit von Guanin an Position -6, eine 53%ige Häufigkeit von Cytosin an Position -4 und in 55 % der Sequenzen ein Cytosin an Position -1. Nach dem Startcodon an Position 4 war wiederum mit 69%iger Wahrscheinlichkeit ein Purin-Nukleosid zu finden.

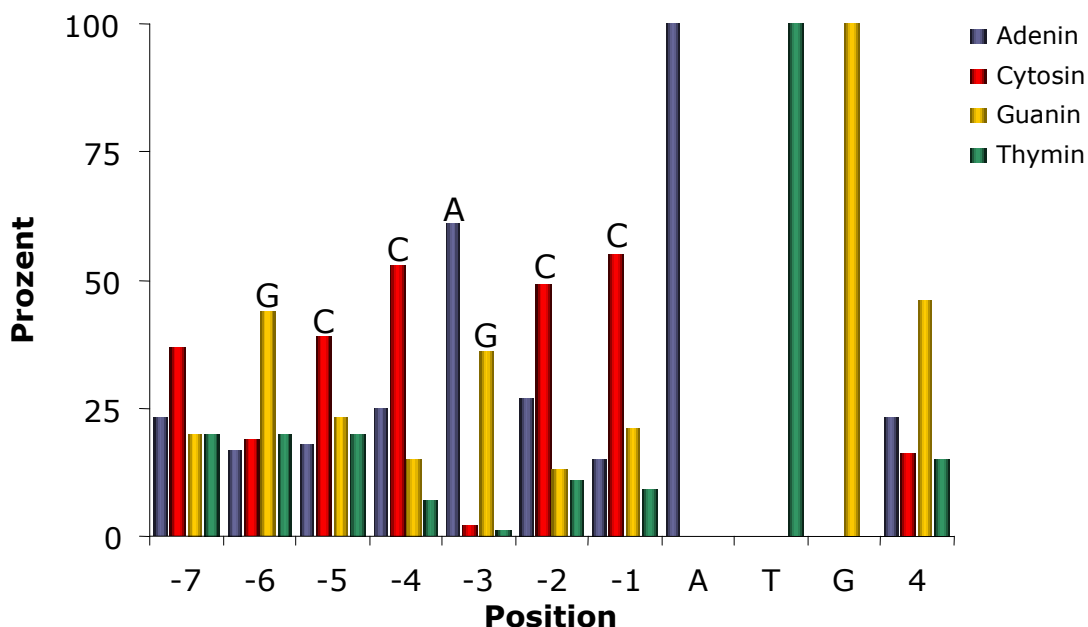


Abbildung 3.30: Kozak-Prinzip; auf der x-Achse ist die Position der Base bezogen auf das angegebene Start-Codon (ATG) angegeben, gegen die Häufigkeit der einzelnen Basen A (Adenin), G (Guanin), C (Cytosin) und T (Thymin). Häufigste Basen der Positionen -1 bis -6 sind angegeben.

Aus diesen Beobachtungen leitete M. Kozak folgende Sequenz um das Startcodon ab, die eine optimale Translation begünstigt:

(GCC) GCC RCC ATG G

wobei R eine Purinbase (A oder G) ist (s. Abbildung 3.30). Bei Gestaltung der Plasmidsequenz des Expressionsvektors sollte das Kozak-Prinzip berücksichtigt werden. Denn dann kann davon ausgegangen werden, dass die Expressionslevel des kodierten Proteins nach der Transfektion des Plasmids in Säugetierzellen gesteigert werden können.

Primerdesign

Das DKK1-Insert von pDONR223 sollte mit Hilfe der in Tabelle 3.41 aufgeführten Primer, die die Kozak-Sequenz entweder berücksichtigten (Kozak) oder nicht (nonKozak), amplifiziert werden.

Tabelle 3.41: verwendete Primersequenzen für DKK1-Insert-Isolierung aus pDONR223.

Primer	Sequenz (5'- 3')
DKK1 _{Kozak} -left	cg GAATTC gtcacc atgatggctctgggcgc
DKK1 _{nonKozak} -left	cg GAATTC ccgatg atggctctgggcgc
DKK1-right	gc TCTAGA gct ttagtgtctctgacaagtgtgaagcc

Restriktionsschnittstellen sind groß und fett dargestellt, Start- bzw. Stop-Codon klein, fett und kursiv und der DKK1-spezifische Primerbereich klein und fett.

Die Primersequenzen wurden nach folgendem Schema aufgestellt:

I) left-Primer:

- Basenüberhang, damit das Restriktionsenzym effektiv arbeiten kann
- Restriktionsschnittstelle für EcoRI
- Kozak- bzw. nonKozak-Sequenz vor dem Startcodon
- Startcodon und nachfolgende Sequenz des ORF von DKK1

II) right-Primer

- Basenüberhang, damit das Restriktionsenzym effektiv arbeiten kann
- Restriktionsschnittstelle für XbaI
- wenige Basen Abstand zur genspezifischen Sequenz
- Stopcodon und vorherige Sequenz des ORF von DKK1.

Die Primersequenzen waren so gewählt, dass das PCR-Produkt aus dem ORF von DKK1 mit zwei verschiedenen Restriktionsstellen an beiden Enden besteht. Nach dem Verdau mit EcoRI und XbaI ist die Sequenz dann über die beiden entsprechenden Schnittstellen in den Expressionsvektor zu klonieren.

3.12.4 Optimierung und Durchführung der DKK1-Insert-Isolierung mittels PCR

① *Da die PCR-Primer nur etwa zur Hälfte an das Plasmid-Template binden, jedoch mit ihrer vollen Länge an die neu synthetisierten DNA-Stränge, ist die Annealingtemperatur zu optimieren. Legt man die Bindung an das Plasmid zugrunde, ergibt sich eine Schmelztemperatur nach der Nearest-Neighbour-Methode von 53 °C (left, nonKozak) bzw. 54 °C (right) und bei einer Bindung über die komplette Sequenz von 67 °C (left) bzw. 68 °C (right). Mit Hilfe des Temperaturgradienten des Opticon wird daher die Annealingtemperatur optimiert. Des Weiteren ist für die verwendete Polymerase die Menge an DMSO im PCR-Ansatz zu optimieren.*

Materialien und Geräte

High-Fidelity DNA-Polymerase Phusion™, Finnzymes, Espoo, Finnland

Phusion-DNA-Polymerase [2 U/μl ⇒ 1 : 10 verdünnt, um

Pipettierungenauigkeiten zu verhindern ⇒ 0,2 U/μl]

5X Phusion-HF-Puffer

DMSO 50%ig

mittels Plasmid-Präparation aufgereinigtes Plasmid pDONR223 mit DKK1

dNTP-Mix, D7295, Sigma [10 mM je dNTPS]

Ampuwa

Primer (Sequenzen siehe 12.1)

DKK1-nonKozak-left

DKK1-right

Thermocycler

Durchführung

Die PCR-Ansätze für die Optimierung hatten ein Volumen von 10 µl und wurden nach dem in Tabelle 3.42 dargestellten Schema pipettiert. Dazu wurde ein Mastermix mit entsprechendem Überschuss für die benötigte Reaktionsanzahl angesetzt. Die PCR wurde mit den in Tabelle 3.43 angegebenen Bedingungen über 30 Zyklen durchgeführt.

Tabelle 3.42: PCR-Reaktionsmix je Reaktionsgefäß für die Optimierung.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
Ampuwa	q.s.	-
5X Phusion-HF-Puffer	2,0 µl	1X
10 mM dNTPs	0,2 µl	200 nM
DKK1-nonKozak-left-Primer	0,4 µl	500 nM
DKK1-right-Primer	0,4 µl	500 nM
Plasmid-DNA	2,0 µl	-
DMSO 50%ig	<div> <div>{</div> <div>0,4 µl</div> <div>0,6 µl</div> <div>0,8 µl</div> </div>	<div> <div>2 %</div> <div>3 %</div> <div>4 %</div> </div>
Polymerase 0,2 U / µl	1,0 µl	0,02 U/µl

zu optimieren

Tabelle 3.43: PCR-Bedingungen für die Optimierung.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec
Denaturierung	98 °C	10 sec
Annealing	zu optimieren*	20 sec
Elongation	72 °C	20 sec
finale Elongation	72 °C	10 min

***Als Annealingtemperatur wurden 57,2 °C / 59,1 °C / 61,2 °C / 63,0 °C / 65 °C / 66,4 °C und 70 °C getestet.**

Um die Reaktionseffizienzen der verschiedenen Ansätze zu vergleichen, wurden die PCR-Produkte auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die Intensität der Produkte verschiedener Annealingtemperaturen und ver-

schiedener DMSO-Konzentrationen verglichen. Die optimalen Bedingungen für das Primerpaar DKK1_{nonKozak}-left/DKK1-right wurden im Folgenden auch für die Amplifikation des Kozak-Produktes angewendet, da sich die beiden left-Primer DKK1_{nonKozak} und DKK1_{Kozak} nur um drei Basen in der Länge unterschieden und das PCR-Produkt bis auf diesen Unterschied in der Primersequenz identisch ist.

Mit den ermittelten optimalen Bedingungen wurden dann zwei 50-µl-PCR-Reaktionen (ebenfalls mit den in Tabelle 3.42 angegebenen Konzentrationen der Reagenzien) mit den beiden Primerpaaren durchgeführt, um zwei PCR-Produkte zu erhalten:

- DKK1 mit einer nicht Kozak-entsprechenden Sequenz: DKK1_{nonKozak}
- DKK1 mit einer Kozak-entsprechenden Sequenz: DKK1_{Kozak}

3.12.5 Quantifizierung der PCR-Produkte

Materialien und Geräte

siehe DNA-Gele in Kapitel 3.7.5

Broad Range DNA Mass Ladder, Cat. No. 11447-100, Marligen Biosciences

Durchführung

Die PCR-Produkte lassen sich nicht unmittelbar per UV quantifizieren, da nicht verbrauchte Primer und Nukleotide mit erfasst würden. Daher war es nötig, eine Verdünnungsreihe der PCR-Produkte (4 – 2 – 1 – 0,5 – 0,25 µl) auf ein 1,2%iges Agarosegel aufzutragen. Die Gelelektrophorese wurde wie in 3.7.5 beschrieben durchgeführt. Die Inserts sind je etwa 800 Bp lang, und als Standard wurde der *Broad Range DNA Mass Ladder* verwendet. Dessen 800-Bp-Bande enthält 16 ng DNA/µl. Von diesem Marker wurden 6,25 µl als Standard pro Reihe auf das Gel aufgetragen, also 100 ng der 800-Bp-Bande pro Reihe. So ließ sich semiquantitativ die DNA-Menge der PCR-Produkte bestimmen, um im Folgenden entsprechende Silica-Mengen einzusetzen.

3.12.6 Glasmilch-Aufreinigung der PCR-Fragmente

① *Silica-Suspension, auch Glasmilch genannt, adsorbiert DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Von Vogelstein und Gillespie wurde dies erstmals genutzt, um DNA aus Agarosegelen zu isolieren.¹⁰³ Nach dem Binden der DNA an Silica kann diese durch Waschen mit Salz-Ethanol-Puffer von Proteinen, Nukleotiden, Agarose etc. gereinigt und durch niedrig-salzige Lösungen wie Wasser oder TE-Puffer gelöst und direkt ohne Fällung weiter verwendet werden. Bei der Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen ist von Vorteil, dass chaotrope Salze die Agarose auflösen und so die Extraktion bei niedrigen Temperaturen ohne Denaturierung der DNA durchgeführt werden kann.*

Materialien und Geräte

DNA Extraktion Kit, Fermentas Life Sciences

Silica-Suspension

Bindungspuffer (6 M Natriumiodid)

Waschpuffer (Tris, NaCl, EDTA, 50 % Ethanol, keine weiteren Konzentrationsangaben)

TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten

1,5-ml-Reaktionsgefäße, steril

Tischzentrifuge

PCR-Produkte DKK1_{nonKozak} und DKK1_{Kozak} aus 3.12.4

Durchführung

Das Volumen der PCR-Ansätze wurde mit TE-Puffer zu je 100 µl ergänzt. Danach wurden zu jedem Ansatz 300 µl Bindungspuffer gegeben und gemischt, dann wurden je 17 µl (von 8,5 µg DNA ausgehend, Herstellerangabe: 2 µl Silicasuspension pro 1 µg DNA) der Silicasuspension zugesetzt und erneut kräftig gemischt. Anschließend wurden die Reaktionsansätze 5 min bei 55 °C im Wasserbad inkubiert und des Öfteren gemischt, um die Silicateilchen in Suspension zu halten. Dann wurden die Silicateilchen 5 sec pelletiert, der Überstand dekantiert und mit 500 µl eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Dazu wurden die Silica-Pellets durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, anschließend erneut 5 sec pelletiert und der Überstand dekantiert. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt, und nach dem letzten Dekantieren wurden die Pellets erneut zentrifugiert und sich noch sammelnder Waschpuffer abpipettiert, um die Pellets anschließend 5

bis 10 min an der Luft zu trocknen. Das Volumen, in dem die DNA von den Silicateilchen gelöst wird, orientiert sich an dem zuvor eingesetzten Volumen der Silicasuspension. Daher wurden die Pellets in je 17 µl TE-Puffer pH 7,5 durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, bei 55 °C und gelegentlichem Schütteln für 5 min inkubiert und die Silicateilchen 30 sec herunterzentrifugiert. Die Überstände wurden in neue 1,5-ml-Reaktionsgefäße überführt. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde dieses Eluieren weitere zweimal mit je 17 µl TE-Puffer durchgeführt. Dann wurden die gesammelten Eluate beider Ansätze erneut 30 sec zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt, um alle Silicateilchen zu entfernen. Jeweils 1,0 µl der Eluate wurde wie in 3.7.4 beschrieben im UV quantifiziert.

3.12.7 Restriktion des Vektors und der Inserts

① Sowohl der Vektor pcDNA3.1(+) als auch die generierten PCR-Produkte des Inserts DKK1 tragen Schnittstellen für die Restriktionsenzyme EcoRI und XbaI. Werden sowohl Vektor als auch PCR-Produkt verdaut, passen beide Sequenzen mit ihren so genannten klebrigen Enden ineinander und können mit Hilfe einer Ligase zyklisiert werden. Beide verwendeten Enzyme haben eine Aktivität von 100 % im Fermentas-Puffer TangoTM, jedoch EcoRI in 2X Puffer und XbaI in 1X Puffer. Daher wird der Verdau zuerst mit EcoRI in 2X Puffer angesetzt, der dann mit Ampuwa zu 1X Puffer verdünnt wird, bevor sich der Verdau mit XbaI anschließt. Nach dem Verdau des Vektors ist es möglich, dass dieser mit dem Spaltprodukt wieder zyklisiert. Um diese Religation zu verhindern, wird der Vektor nach dem Verdau mit Hilfe der Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIP) dephosphoryliert. Dieses Enzym spaltet 3'- und 5'-Phosphatgruppen von Nukleinsäuren ab, so dass eine Religation nicht mehr stattfinden kann.

Materialien und Geräte

Ampuwa

Alkalische Phosphatase CIP, F-2015, Finnzymes [10 U/µl]

EcoRI, #ER0271, Fermentas Life Sciences [10 U/µl]

XbaI, #ER0681, Fermentas Life Sciences [10 U/µl]

mit TangoTM-Restriktionspuffer [33 mM Tris-Acetat, pH 7,9 bei 37 °C,
10 mM MgAc, 66 mM NaAc, 0,1 mg/ml BSA]

pcDNA3.1(+), V790-20, Invitrogen

aufgereingte PCR-Produkte DKK1_{Kozak} und DKK1_{nonKozak} aus 3.12.6

Wasserbad, auf 37 °C aufgeheizt

Wasserbad, auf 65 °C aufgeheizt

Thermocycler

Durchführung

Für den Verdau wurden das komplette Lysat der Aufreinigung der PCR-Produkte und 10 µg des als Plasmid-Präparation vorliegenden Vektors pcDNA3.1(+) eingesetzt. Die Inserts und der Vektor wurden jeweils zuerst in 60 µl-Ansätzen in 2X TangoTM mit 20 U EcoRI über 2 h bei 37 °C verdaut. Anschließend wurde jedem Ansatz 25 U XbaI zugesetzt, das Volumen auf 120 µl mit Ampuwa ergänzt und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau der beiden Inserts (DKK1_{Kozak} und DKK1_{nonKozak}) wurde nach 2 h durch 10 min Erhitzen auf 65 °C gestoppt. Für die Dephosphorylierung des Vektors wurden dem Vektor-Verdau 4 U Alkalische Phosphatase (CIP) zugesetzt und dieser für weitere 30 min bei 37 °C inkubiert. Um die CIP und Restriktionsenzyme zu inaktivieren, wurden die Ansätze anschließend für 10 min bei 85 °C im Thermocycler erhitzt.

3.12.8 Aufreinigung der Restriktionsansätze über Kristallviolett-Agarosegele

① *Kristallviolett wandert als Kation zur Kathode, also gegenläufig zur negativ geladenen DNA. Trifft Kristallviolett jedoch auf DNA, wird es von dieser mitgenommen und die DNA-Bande ist unmittelbar als violette Bande sichtbar. Das hat den Vorteil, dass das Gel nicht DNA-schädigendem UV-Licht ausgesetzt werden muss, um die gelaufenen Fragmente zu erkennen.*

Materialien und Geräte

siehe Agarosegele in Kapitel 3.7.5

Kristallviolett

1X TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten

SeaPlaque[®] GTG Agarose, Art. Nr. 50111, Cambrex Bioscience

Durchführung

Um die geschnittenen Inserts und den geschnittenen Vektor von Enzymen, Salzen und unerwünschten Fragmenten aufzureinigen, wurde mit jedem Restriktionsansatz eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Um die gewünschten Banden leichter aus dem Gel zu isolieren, wurde die niedrig schmelzende Agarose SeaPlaque® GTG eingesetzt. Für den etwa 5,4 kb großen Vektor wurde ein 0,8%iges Gel verwendet, für die etwa 800 Bp langen Inserts ein 1,0%iges Gel. Der Agarose-Lösung wurde vor dem Gießen des Gels so viel Kristallviolett (in Wasser gelöst) zugesetzt, dass die Lösung leicht violett erschien. Um genügend große Taschen zu bekommen, wurden Zähne des Gelkammes vor dem Gießen des Gels mit Klebestreifen verbunden. Die Restriktionsansätze wurden mit 40 µl 100 %igem Glycerol versetzt und 120 µl in eine große Geltasche geladen.

Die Elektrophorese wurde in der Elektrophoresekammer bei 45 V über 25 min durchgeführt. Die sichtbare Bande der entsprechenden Größe wurde je vorsichtig mit einem Skalpell ausgeschnitten und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Aus dem Gel konnte die DNA erneut mit Silica isoliert werden, jedoch wurde nun entsprechend des Gewichtes jedes Gelstücks dieses mit dem dreifachen Volumenteil des Puffers versetzt und bei 55 °C im Wasserbad gelöst. Nach Zugabe von 20 µl Silica-Suspension (Vektor-DNA) bzw. 15 µl (Insert-DNAs) wurde, wie in 3.12.6 beschrieben, fortgefahren. Dann wurden die Vektor-DNA mit 50 µl und die Insert-DNAs mit je 30 µl TE-Puffer aus dem Silica-Pellet gelöst und jeweils 1,0 µl mittels UV, wie in 3.7.4 beschrieben, quantifiziert. Für die spätere einfachere Handhabung wurden der geschnittene Vektor zu 50 ng/µl und die Inserts zu je 25 ng/µl mit 1X TE-Puffer verdünnt.

3.12.9 Ligation des Vektors, Vermehrung und Isolierung

Für die Ligation der Inserts mit dem Vektor wurde das molare Verhältnis 3 : 1 gewählt. Das entspricht je Ligation bei einer einzusetzenden Masse von 50 ng des Vektor (1 Teil = 14×10^{-15} mol) 22 ng des Inserts (3 Teile = 42×10^{-15} mol), wenn man von einem Molekulargewicht von 660 g/mol je Bp ausgeht:

Länge des Vektor:	5 400 Bp
M_{Vektor} :	$3,564 \times 10^6$ g/mol
50 ng:	14×10^{-15} mol
Länge des Inserts:	800 Bp
M_{Insert} :	$0,528 \times 10^6$ g/mol
42×10^{-15} mol:	22 ng

Materialien und Geräte

T4-DNA-Ligase, #EL0334, Fermentas Life Science

T4-DNA-Ligase [1 U/μl]

10X Ligationspuffer [400 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT,
5 mM ATP, pH 7,8 bei 25 °C]

Ampuwa

Vektorlösung [50 ng/μl] aus 3.12.8

Insertlösungen [25 ng/μl] aus 3.12.8

Thermocycler

PureLink™ HiPure Plasmid Midiprep Kit, Invitrogen

Durchführung

Es wurden zwei Ligationsansätze angesetzt: pcDNA3.1(+) mit DKK1_{Kozak}-Insert und pcDNA3.1(+) mit DKK1_{nonKozak}-Insert (siehe Tabelle 3.44). Beide Ansätze wurden für 2 h bei RT inkubiert und die Ligation durch 10 min Erhitzen auf 65 °C gestoppt. 2,0 μl eines jeden Ligationsansatzes wurden für die Transformation, die analog zu Kapitel 3.10.2 durchgeführt wurde, in *Top10F'*-E.coli eingesetzt. Wiederum wurden die E. coli auf Agarplatten ausgestrichen, jeweils drei Klone gepickt und in LB kultiviert, bevor die Plasmide mittels Midiprep entsprechend dem Invitrogenprotokoll isoliert wurden. Nach der UV-Quantifizierung (siehe Kapitel 3.7.4) konnten diese für die folgenden Transfektionen eingesetzt werden.

Tabelle 3.44: Ligationsansatz für die Ligationen des pcDNA3.1-Vektors mit den DKK1-Sequenzen DKK1_{Kozak} und DKK1_{nonKozak}.

Reagenz	Volumen	finale Konzentration
10X Ligationspuffer	2 μl	1X
Vektor [50 ng/μl]	1,0 μl	$0,7 \times 10^{-15}$ mol/μl
Insert [25 ng/μl]	0,9 μl	$2,1 \times 10^{-15}$ mol/μl
Ampuwa TM	13,6 μl	-
T4-DNA-Ligase [1 U/μl]	2,5 μl	0,125 U/μl

3.13 Transfektion und Expression von DKK1

3.13.1 Optimierung der Transfektion

Calciumphosphat-Transfektion

① *Mischt man DNA, Calciumionen und Phosphatpuffer, bildet sich ein feinkörniger Niederschlag aus DNA und Calciumphosphat. Dieser Niederschlag wird auf die Zellen pipettiert, die dann die DNA per Endozytose aufnehmen und in den Zellkern transportieren. Die genauen Mechanismen sind nicht bekannt. Nachdem die DNA in den Zellkern gelangt ist, wird sie transkribiert und translatiert. Um die Aufnahme der DNA-Präzipitate zu fördern, wurden verschiedene Methoden entwickelt. Zum einen erhöht ein so genannter Glycerolschock die Aufnahme der DNA in die Zelle.¹⁰⁴ Der genaue Mechanismus ist nicht bekannt, jedoch scheint Glycerol oder DMSO die bereits intrazellulär aufgenommene DNA vor Nukleasen zu schützen.¹⁰⁵ Zum anderen kann die Transfektionseffizienz durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Chloroquin gesteigert werden. Auch hierbei ist der Wirkmechanismus nicht geklärt: Es wird vermutet, dass Chloroquin die Ansäuerung der Lysosomen und Endosomen und dadurch eine Aktivierung DNA-degradierender Enzyme verhindert.¹⁰⁶*

Optimierung der Transfektionsmethode

Generell wurden die Zellen 24 h vor der Transfektion ausgesät, eine Stunde vor der Transfektion, wurde das Nährmedium abgesaugt und durch frisches Nährmedium ersetzt (300 µl pro Well einer 24-Well-Platte bzw. 1700 µl pro Well einer 6-Well-Platte). Ebenso wurde, wenn kein Glycerolschock durchgeführt wurde, das Nährmedium 24 h nach der Transfektion entfernt, die Zellen mit 1X PBS-Puffer gewaschen und mit frischem Nährmedium versorgt.

Verschiedene Varianten der Calciumphosphat-Transfektion sind beschrieben. Ausgehend von der Cal27-Zelllinie wurden

- die optimale Zellzahl pro 24-Well,
- die optimale DNA-Menge,
- die Transfektionseffizienz mit 10 % FKS, 5 % FKS, ohne FKS und
- die Transfektionseffizienz bei 3 % bzw. 5 % CO₂

bestimmt und diese Bedingungen auf andere Zelllinien übertragen. Für jede Zelllinie wurde anschließend getestet, welche der folgenden Bedingungen die höchste Transfektionseffizienz ergab:

- einfache Calciumphosphat-Transfektion, nur DNA
- DNA, mit Chloroquin vorbehandelte Zellen
- DNA, Glycerolschock
- DNA, mit Chloroquin vorbehandelte Zellen, Glycerolschock

Generelle Durchführung

Benötigte Lösungen

Plasmide

2X BBS-Puffer

CaCl₂-Lösung

0,1X TE pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten

1X PBS

Durchführung

24 h vor der Transfektion wurden die Zellen in 6- oder 24-Well-Platten ausgesäht. Für die Calciumphosphat-Transfektion wurden pro 24er-Well etwa 0,5 h vor der Transfektion 0,67 µg/cm² DNA mit 4,4 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung versetzt und mit 0,1X TE-Puffer pH 7,5 zu 44 µl ergänzt. Dieser Ansatz wurde auf dem Vortex gemischt und dabei langsam tropfenweise 44 µl 2X BBS zugegeben. Nachdem der Ansatz für 20 min bei RT stehen gelassen worden war, wurde er im Well gleichmäßig auf dem Nährmedium verteilt. Die Zellen wurden danach bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Für ein Well einer 6-Well-Platte wurden 0,67 µg/cm² DNA mit 25 µl 2,5 M CaCl₂-Lösung und 0,1X TE-Puffer pH 7,5 zu 250 µl ergänzt, zu denen 250 µl 2X BBS zugegeben wurden.

Chloroquin-Vorbehandlung

Benötigte Lösungen

Chloroquin-Lösung [8 mg/ml]

Durchführung

2 h vor der geplanten Transfektion wurde das Nährmedium der 22 h zuvor ausgesähten Zellen mit 40 µg/ml Chloroquin versetzt. Anschließend wurde, wie zuvor beschrieben, die Calciumphosphat-Transfektion durchgeführt.

Glycerolschock

Benötigte Lösungen

Glycerol 60%ig

2X BBS

Reinstwasser, steril filtriert

Durchführung

Etwa 4 h nach der Transfektion wurden das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 100 µl 15%igem Glycerol in 1X BBS (1 T 60%iges Glycerol, 1 T Reinstwasser, 2 T 2X BBX) für 2 min bei 37 °C inkubiert. Nach anschließendem Waschen der Zellen mit 1X PBS wurden diese mit frischem Nährmedium bedeckt.

3.13.2 Geneticin-Selektion transfizierter Zellen

Geneticin

① Wegen der geringen Transfektionseffizienz müssen erfolgreich transfizierte Zellen über Selektionsmarker identifiziert und selektiert werden. Diese Selektionsmarker werden zusammen mit dem zu exprimierenden Gen auf dem gleichen Transfektionsplasmid in die Zelle eingeschleust. Häufige Anwendung als Selektionsmarker findet das bakterielle neo-Gen, das für die Aminoglykosid-Phosphotransferase APH(3') kodiert. Dieses inaktiviert das Aminoglykosid-Antibiotikum Geneticin (G418) durch Phosphorylierung. Geneticin (Strukturformel siehe Abbildung 3.31) bindet an 80S-Ribosomen und hemmt die Translation. Die effektive Dosis variiert bei verschiedenen Zelltypen, daher muss vor der Selektion die Geneticin-toleranzdosis jeder Zelllinie bestimmt werden.

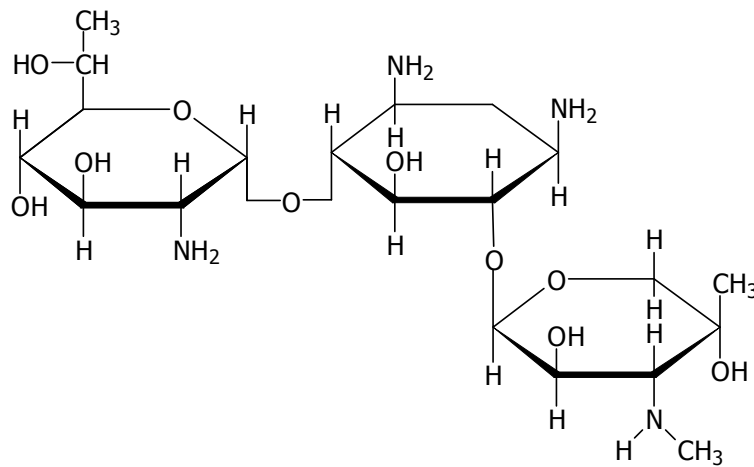


Abbildung 3.31: Strukturformel von Geneticin (G418).

Die nicht-transfizierten Zellen sterben bei Kultivierung mit Geneticin-haltigem Nährmedium entsprechender Konzentration nach 1 bis 2 Zellteilungen ab, transfizierte Zellen sind in der Lage, durch Expression einer Aminoglykosid-Phosphotransferase Geneticin zu inaktivieren. Wachsende Klone können nach etwa einer Woche beobachtet werden.

Bestimmung der Geneticin-Toleranzdosis

Materialien

Geneticin-Stammlösung

DMEM-Medium

24-Well-Platte

Durchführung

In acht Wells einer 24-Well-Platte wurden 20 000 Zellen pro Well ausgesät und für 4 h anheften gelassen. Ab dann wurden die Zellen für bis zu 14 Tage mit verschiedenen Geneticin-Konzentrationen in Nährmedium kultiviert und beobachtet. Die finalen Geneticin-Konzentrationen betrugen hierbei 0 – 100 – 200 – 300 – 400 – 500 – 600 – 700 µg/ml. Etwa alle drei Tage wurde das Nährmedium gewechselt. Bei effektiven Geneticin-Konzentrationen begannen die Zellen nach ein bis zwei Zellteilungen abzusterben. Für die beiden Cal27-Zelllinien lag diese bei 600 µg/ml Geneticin. Diese Konzentration wurde für die folgende klonale Selektion verwendet.

3.13.3 Klonale Selektion

Materialien

96-Well-Platten, 24-Well-Platten und 6-Well-Platten

Trypsin-EDTA 0,25%ig

DMEM-Medium mit 600 µg/ml bzw. 300 µg/ml Geneticin

Heizblock

Durchführung

Nach der Geneticin-Selektion der transfizierten Zellen wurden Multiklone erhalten. Für die weitere klonale Selektion wurden die Multiklone sehr dünn in 6-Well-Platten (ca. 10 Zellen / Well) und auch 96-Well-Platten (ca. 50 Zellen / Platte) ausgesät. Nach ca. zwei Wochen konnte das Wachstum einzelner Kolonien beobachtet werden, die markiert und weiterhin beobachtet wurden. Bei ausreichender Größe – etwa als sie ohne Mikroskop in der Zellkulturschale wahrgenommen werden konnten – wurden die einzelnen Kolonien trypsiniert und jede Kolonie in ein Well einer 96-Well-

Platte überführt. Nach weiteren zwei Wochen waren erste Wells konfluent und wurden in jeweils ein Well einer 24-Well-Platte überführt. Nun wurde die Geneticin-Dosis halbiert, da die Selektion der Cal27- und Cal27res-Klone abgeschlossen war, der Selektionsdruck aber weiterhin durch Zugabe von 300 µg/ml Geneticin aufrechterhalten wurde.

3.13.4 PCR-Selektion der Klone

Materialien

1X TE-Puffer pH 7,5 für molekularbiologische Arbeiten

1X PBS

Trypsin-EDTA 0,25%ig

DMEM-Medium mit 300 µg/ml Geneticin

0,2-ml-Reaktionsgefäße

DKK1-Primer, T7/BGH-Primer und E61-Primer [12,5 µM]

2X *Quantitect SYBR Green PCR Master Mix*

Ampuwa

PCR-Reaktionsgefäße, Abgene: 8er-Streifen (weiß) und ultraklare Deckel

Durchführung

Bei einer Konfluenz eines Klons in einem Well der 24-Well-Platte wurden die Zellen mit 1X PBS gewaschen und mit 100 µl Trypsin inkubiert. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurden 80 µl der Trypsin-Zell-Suspension in ein 0,2-ml-Reaktionsgefäß, das bereits 80 µl 1X PBS enthielt, überführt. Die Zellen wurden mittels Short Spin in einer geeigneten Zentrifuge herunterzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 50 ml 1X TE-Puffer pH 7,5 resuspendiert. Diese Suspension wurde zur Lyse der Zellen 3 bis 5 min im Heizblock aufgekocht. Nach dem Abkühlen wurden die Proben erneut mittels Short Spin zentrifugiert und der Überstand diente als Template für die folgende PCR. Der PCR-Mastermix wurde für jede Probe entsprechend Tabelle 3.45 eingesetzt und die PCR-Bedingungen für die folgenden PCR über 40 Zyklen sind in Tabelle 3.46 angegeben. Leervektor-transfizierte Zelllysate wurden mit T7/BGH- und E61-Primern amplifiziert, wobei die E61-Primer als Positiv-Kontrolle genomische DNA amplifizierten und T7/BGH-Primer den Leervektor

detektieren. Die DKK1-Klone wurden anstatt mit T7/BGH-Primern mit DKK1-Primern amplifiziert, die über Exon-Exon-Schnittstellen gelegt wurden, so dass sie nur die DKK1-Sequenz des DKK1-Vektors amplifizieren können. Auf diese Weise kann zwischen Klonen unterschieden werden, die einen Vektor (pcDNA3.1 bzw. pcDNA3.1-DKK1) aufgenommen haben und denen, die den Vektor nicht aufgenommen haben. Positive Klone wurden weiter kultiviert und, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, eingefroren.

Tabelle 3.45: PCR-Reaktionsansatz für die PCR aus Zelllysaten zur Selektion der Klone.

Reagenz	Volumen
Lyse-Überstand	2,0 µl
Ampuwa	2,2 µl
linker Primer	0,4 µl
rechter Primer	0,4 µl
<i>2X Quantitect Master Mix</i>	5,0 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl

Tabelle 3.46: PCR-Bedingungen für die Selektion der Klone aus Zelllysaten.

Schritt	Temperatur	Zeit
initiale Denaturierung	95 °C	15 min
35 Zyklen	Denaturierung	94 °C
	Annealing	57 °C
	Elongation	72 °C
finale Elongation	50 °C	1 min

3.14 DKK1-ELISA

3.14.1 Durchführung des DKK1-ELISA

① *DKK1 ist ein in das Nährmedium sezerniertes Protein. Die Proteine des Nährmedienüberstandes können an speziell beschichtete Mikrotiterplatten gebunden werden. Die Oberfläche dieser Platten hat kovalent gebundene Maleimid-Gruppen, die, wie in Abbildung 3.32 dargestellt, kovalente Bindungen mit Sulfhydrylgruppen der Proteine in Lösung ausbilden können.*

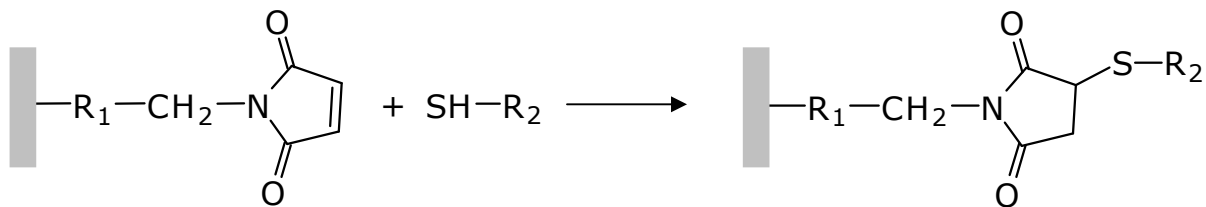


Abbildung 3.32: Bindung von Sulfhydryl-Gruppen an Maleimid-beschichtete Oberflächen.

Einmal gebunden, kann DKK1 spezifisch mittels Antikörper-Antikörper-Reaktionen detektiert werden. Diese Reaktion erfolgt analog zum BrdU-Test, da der sekundäre Antikörper HRP-markiert ist und das Substrat TMB umsetzt (siehe Kapitel 3.5).

Materialien und Geräte

ELISA-Waschpuffer, gekühlt

ELISA-Blockierungspuffer

ELISA-Antikörperversüßungslösung

ELISA-Stopplösung

humaner polyklonaler DKK1-Antikörper, AF1096, R&D Systems, Wiesbaden
gelöst in PBS [0,1 mg/ml], aliquotiert und bei -20 °C gelagert

humanes DKK1, rekombinant, 1096-DK-010, R&D Systems
gelöst in PBS [10 µg/ml], aliquotiert und bei -20 °C gelagert

Anti-Goat IgG-HRP Antibody, HAF109, R&D Systems

Corning® 96well Polystyrene Sulfhydryl-BIND™-Mikrotiterplatte,
Art.-Nr. 2509, Corning, NY

Substrat Reagent Pack, DY999, R&D Systems

enthält *Color Reagent A* (stabilisiertes Wasserstoffperoxid)
und *Color Reagent B* (stabilisiertes Tetramethylbenzidin)

Schüttler MS1 Minishaker, IKA® Works

FLUOstar OPTIMA, bmg Labtech GmbH

Durchführung 1. Tag

Alle zu pipettierenden Proben wurden auf Eis bereitgestellt, da nach dem Öffnen der Verpackung der Platte diese innerhalb einer halben Stunde pipettiert werden musste. Je Well wurden 100 µl der Proben hineingegeben und die beladene Platte zum Binden der Antigene über Nacht im Kühlschrank gelagert.

Vorbereitung 2. Tag

Am zweiten Tag, an dem die ELISA-Platte entwickelt wurde, waren die Antikörperlösungen frisch herzustellen:

- Primäre Antikörperlösung [0,8 µg/ml in PBS mit 0,1 % BSA]
- Sekundäre Antikörperlösung [1 : 7 500 in PBS mit 0,1 % BSA]
- Substratlösung [1 : 1-Mischung von *Color Reagent A* und *B*]

Durchführung 2. Tag

Am nächsten Morgen wurde die Probelösung entfernt, indem die Platte in die Zytostatika-Abfalltonne (wenn es Cisplatin-haltige Nährmedien waren, sonst in das Waschbecken) entleert wurde und Reste wurden durch vorsichtiges Aufschlagen der Platte auf ein Papiertuch entfernt.

Dann wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen, indem der Waschpuffer aus einem Becherglas vorsichtig über die Platte gegossen wurde, so dass alle Wells gefüllt waren. Wichtig war, dass am Boden der Wells keine Luftblasen mehr waren. Die Platte wurde in das Waschbecken entleert (bzw. beim ersten Waschen in die Zytostatika-Abfalltonne, wenn sie mit Cisplatin-haltigem Nährmedium beladen war), und restlicher Puffer wurde durch vorsichtiges Aufschlagen der Platte auf ein Papiertuch entfernt.

Je Well wurden mit Hilfe einer Mehrkanalpipette 200 µl Blockierungspuffer dazu gegeben und bei RT und leichtem Schütteln (150 rpm) für 1,5 h inkubiert. Wieder wurde die Platte dreimal mit ausreichend Waschpuffer gewa-

schen, und Flüssigkeitsreste wurden wie oben beschrieben entfernt. Je Well wurden 50 µl der primären Antikörperlösung hinzugegeben und die Platte für 2 h bei RT und leichtem Schütteln (150 rpm) inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurden 50 µl der sekundären Antikörperlösung in jedes Well pipettiert und die Platte bei 150 rpm und RT für 30 min geschüttelt. Der sekundäre Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt, und in jedes Well wurden 100 µl der Substratlösung pipettiert.

Die Stopplösung wurde bereitgestellt, und bei ausreichender Blaufärbung der Platte wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 µl ELISA-Stopplösung gestoppt. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450$ nm gegen die Referenzwellenlänge von $\lambda = 544$ nm gemessen. Die Absorption bei 544 nm wurde von der Absorption bei 450 nm subtrahiert, um optische Störungen der Platte zu eliminieren.

3.14.2 Standardisierung des DKK1-ELISA

Die Konzentration von sezerniertem DKK1 im Nährmedienüberstand ist abhängig von der Zellzahl. Um dies zu standardisieren, wurde eine von zwei Methoden der Standardisierung je nach Praktikabilität im jeweiligen Experiment durchgeführt. Zum einen bestand die Möglichkeit, die Zellen mittels Casy[®]-Zellzählgerät zu zählen (siehe Kapitel 3.2.2). Dies wurde vor allem dann durchgeführt, wenn die Zellen nicht in 96-Well-Platten kultiviert wurden. Bei einer großen Anzahl paralleler Versuchsansätze wurde zusätzlich zu der Kultivierung der Zellen für den ELISA in 96-Well-Platten eine gleiche Zelldichte in 6-Well-Platten ausgesäht, die dann parallel zur Probengewinnung aus 96-Well-Platten mittels Casy gezählt werden konnten. Zum anderen bestand die Möglichkeit, die angehefteten Zellen nach der Probengewinnung aus 96-Well-Platten mittels SRB anzufärben und so durch die Absorptionsmessung den Proteingehalt der Zellen zu ermitteln (siehe Kapitel 3.4).

3.15 Beeinflussung des WNT-Signalweges

3.15.1 (2'Z,3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxim

Der über Calbiochem erhältliche GSK-3-Inhibitor (2'Z,3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxim, kurz BIO genannt, ist ein roter, in DMSO löslicher Feststoff mit der in Abbildung 3.33 dargestellten Struktur.

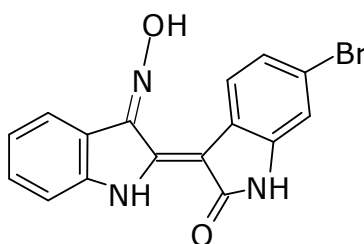


Abbildung 3.33: Strukturformel des GSK-3-Inhibitors BIO.

Laut Datenblatt der Firma Calbiochem ist die Substanz in der Lage, in die Zellen einzudringen und dort als selektiver, reversibler und ATP-kompetitiver Inhibitor der GSK-3 α/β zu wirken ($EC_{50} = 5$ nM). Die Inhibierung der GSK führe zu einer Aktivierung des Wnt-Signalweges. BIO wurde wegen seiner Spezifität gegenüber GSK-3 α/β ausgewählt, andere Kinasen werden erst bei einer Konzentration größer 83 nM inhibiert.

Um zu untersuchen, ob BIO einen Einfluss auf die Sensitivität der Zelllinie Cal27res gegen Cisplatin hat, wurde ein MTT-Test mit Cisplatin, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von BIO (1 μ M, 200 nM und 50 nM) durchgeführt.

3.15.2 1-Azakenpaullon

Das 1-Azakenpaullon (Strukturformel siehe Abbildung 3.34) ist ein potenter, ATP-kompetitiver Inhibitor der GSK-3 β mit einer mehr als 100fach erhöhten Selektivität gegenüber GSK-3 β im Vergleich zu Cdk1/CyclinB und Cdk5/p25. Es wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Conrad Kunick, TU Braunschweig, zur Verfügung gestellt. Die hellbraune Substanz ist ebenfalls in DMSO löslich.

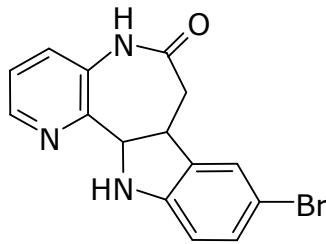


Abbildung 3.34: Strukturformel des GSK-3 β -Inhibitors 1-Azakenpaullon.

Um zu untersuchen, ob 1-Azakenpaullon einen Einfluss auf die Sensitivität der Zelllinie Cal27res gegen Cisplatin hat, wurde ein MTT-Test mit Cisplatin, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, unter Zusatz verschiedener Konzentrationen des Paullons (2 000 nM, 1 000 nM, 500 nM und 200 nM) durchgeführt.

3.15.3 DKK1

Inwieweit der Zusatz von rekombinantem DKK1 einen Einfluss auf die Sensitivität der Zellen gegen Cisplatin hat, wurde durch Zusatz von 20 ng/ml DKK1 zum Nährmedium im MTT-Test mit Cisplatin untersucht. Dieser wurde wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben durchgeführt.

3.15.4 DKK1-Antikörper

Um auf der anderen Seite sezerniertes DKK1 im Nährmedienüberstand abzufangen, wurde dem MTT-Test DKK1-Antikörper in einer Konzentration von 1 μ g/ml zugesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung und Charakterisierung der Zelllinien

4.1.1 Etablierung der Zelllinie Cal27res

Durch die passagenweise Kultivierung in Cisplatin-haltigem Nährmedium war es möglich, ausgehend von der Cisplatin-sensitiven Zelllinie Cal27 die Cisplatin-resistente Subzelllinie zu etablieren (genauere Angaben siehe Kapitel 3.2.3). Parallel durchgeführte Versuche, ausgehend von der Zelllinie Kyse510 ebenfalls eine Cisplatin-resistente Subzelllinie zu etablieren, waren nicht erfolgreich. Obwohl die Zelllinie Kyse510 etwas sensibler auf Cisplatin reagierte als Cal27, war eine Resistenzentwicklung über Monate nicht zu beobachten. Daher wurde in den folgenden Versuchen das Zellpärchen Cal27 / Cal27res untersucht.

4.1.2 MTT-Test

Variationen der Zellzahl

Der MTT-Test war in unserer Arbeitsgruppe etabliert. Jedoch wurde der Einfluss unterschiedlicher Zelldichten, die kleiner als die optimale Zelldichte waren, auf die pEC_{50} -Werte noch nicht untersucht. Als optimale Zelldichte war die Zellzahl pro Well bestimmt worden, die nach der 72-stündigen Inkubation des MTT-Test in der Kontrolle 90-95 % konfluente Zellen hervorbrachte.

Die optimale Zellzahl für die beiden Cal27-Zelllinien lag bei 4 000 Zellen pro Well. Um die Frage zu klären, ob geringere Zelldichten einen Einfluss auf die pEC_{50} -Werte haben, wurden 1 000, 2 000, 3 000 und 4 000 Zellen pro Well beider Zelllinien ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Nach einer 71stündigen Inkubation wurden die Zellen für eine weitere Stunde mit MTT, wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben, inkubiert und lysiert. Die

angepassten Konzentrations-Effekt-Kurven der gemessenen Absorptionen sind in Abbildung 4.1 für die beiden Zelllinien Cal27 (A) und Cal27res (B) dargestellt. Man erkennt, dass sich das obere Plateau der Kurven, besonders bei Cal27res (siehe Abbildung 4.1 B) ungefähr proportional zur Zellzahl verhält. Dies entspricht der Erwartung, da viele Zellen entsprechend mehr MTT zum farbigen Formazan umsetzen als weniger Zellen.

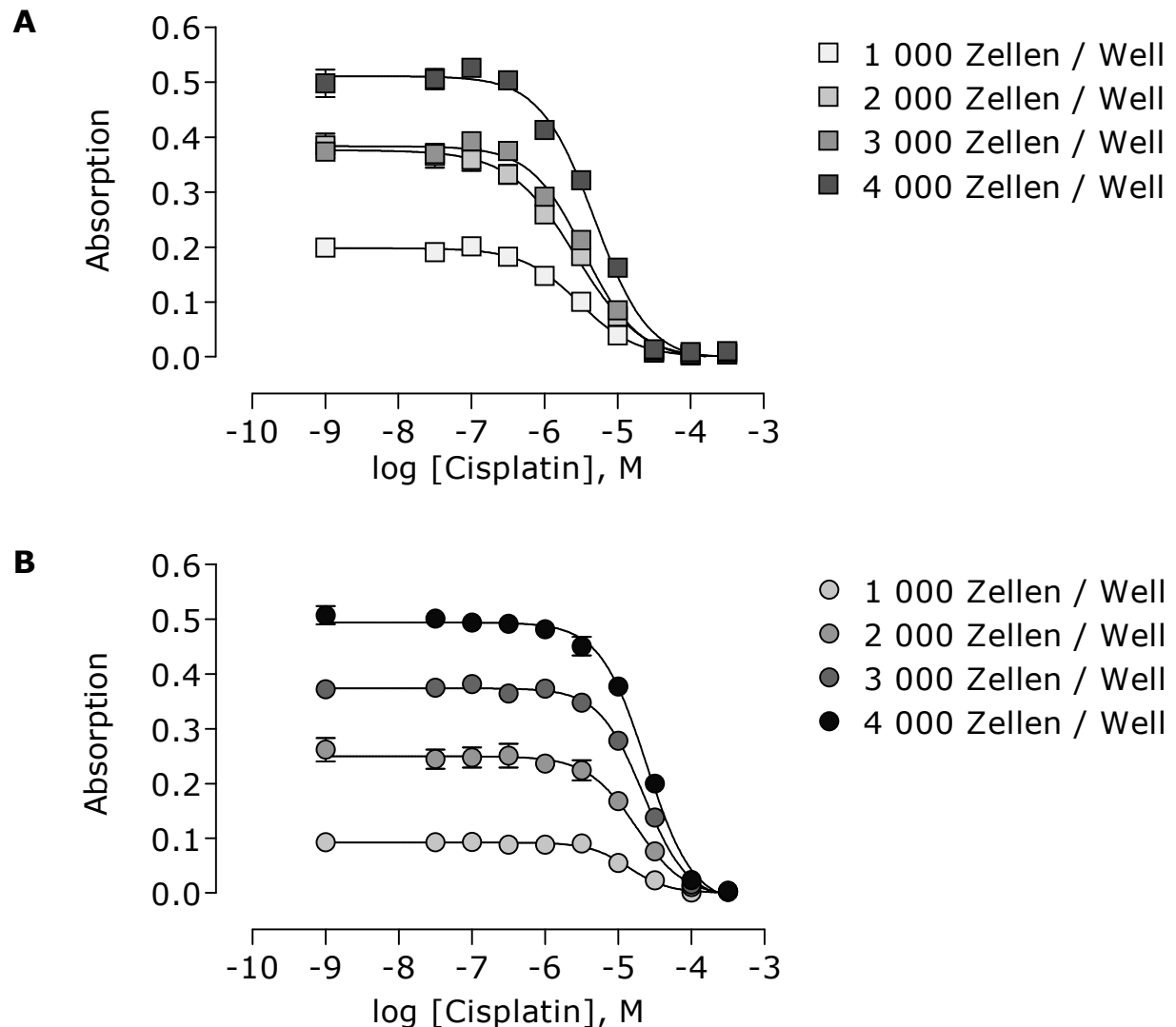


Abbildung 4.1: Einfluss unterschiedlicher Zellzahlen im MTT-Test bei Cal27 (A) bzw. Cal27res (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SE aus $n = 1$ mit 3 Replikaten. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Cisplatin inkubiert, diese Werte sind darstellungsbedingt als Konzentration 10^{-9} M angegeben.

Inwieweit sich die ermittelten pEC_{50} -Werte der Kurven voneinander unterscheiden, wurde mittels eines paarweisen Vergleiches der pEC_{50} -Werte

nach Tukey ermittelt. Welche pEC_{50} -Werte signifikant voneinander verschieden sind, ist in Abbildung 4.2 dargestellt.

Bei Cal27res (siehe Abbildung 4.2 B) erkennt man, dass sich ein Unterschied von 1 000 Zellen mehr oder weniger pro Well nicht signifikant auf den pEC_{50} -Wert auswirkt. Signifikante Unterschiede zeigen sich erst bei dem Vergleich der pEC_{50} -Werte der MTT-Tests mit 1 000 gegen 3 000 Zellen pro Well ($p < 0,05$) bzw. 2 000 gegen 4 000 Zellen pro Well ($p < 0,01$). Dementsprechend sind auch die pEC_{50} -Werte des MTT-Tests 1 000 gegen 4 000 Zellen pro Well mit $p < 0,01$ signifikant verschieden. Für Cal27res ist hier eine Korrelation der Zellzahl mit der Cisplatin-Resistenz der Zellen zu erkennen.

Nicht so deutlich ist das Ergebnis für Cal27 (siehe Abbildung 4.2 A). Zwar unterscheiden sich auch hier die Ergebnisse zwischen 1 000 und 2 000 bzw. zwischen 2 000 und 3 000 Zellen pro Well nicht signifikant ($p > 0,05$), jedoch ist ein signifikanter Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten der MTT-Tests mit 3 000 und 4 000 Zellen pro Well zu erkennen ($p < 0,05$). Ebenso unterscheiden sich die pEC_{50} -Werte zwischen 1 000 bzw. 2 000 und 4 000 Zellen pro Well signifikant.

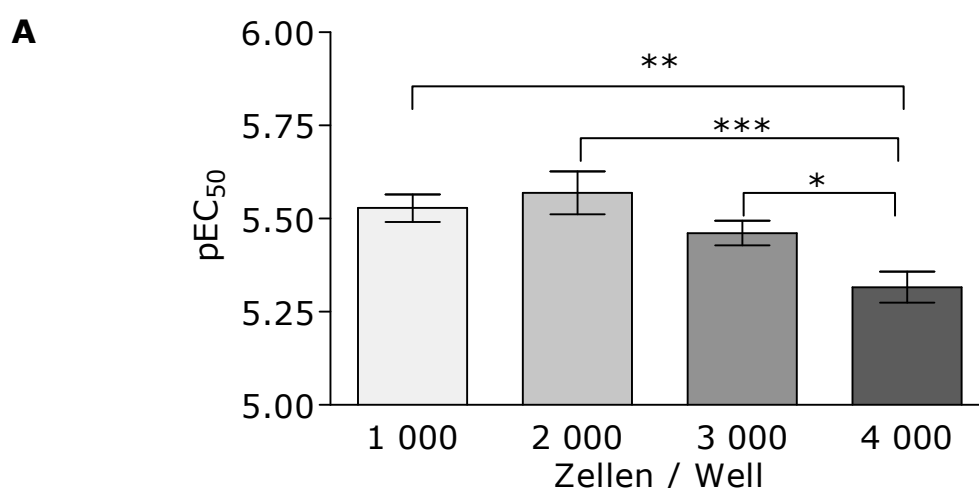


Abbildung 4.2 A. Legende siehe nächste Seite.

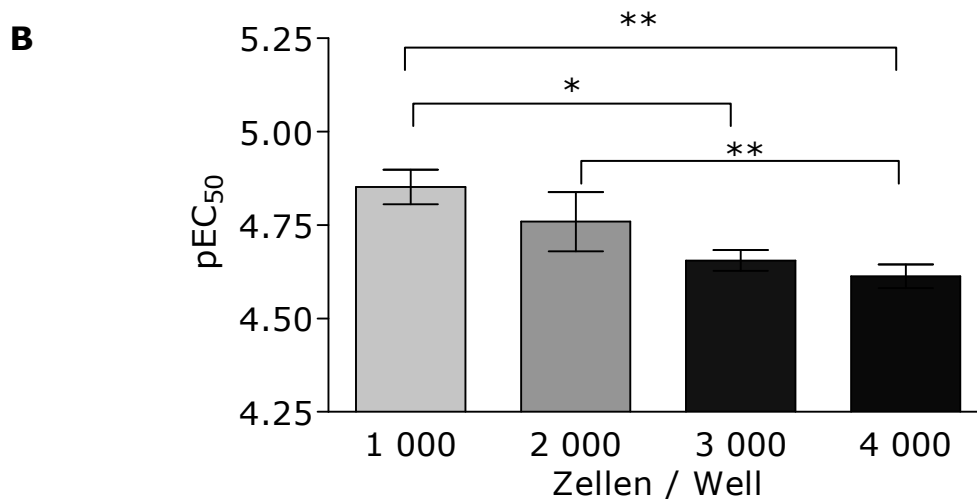


Abbildung 4.2: Vergleich der pEC₅₀-Werte des MTT-Tests von Cal27 (A) bzw. Cal27res (B) mit verschiedenen Zellzahlen mittels eines paarweisen Vergleichs nach Tukey (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und * = $p < 0,001$). Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit 3 Replikaten.**

Eine Optimierung der Zellzahl für den MTT-Test ist demnach nötig, auch wenn Schwankungen der Zellzahl um 1 000 Zellen pro Well meist keine signifikanten Änderungen der pEC₅₀-Werte hervorrufen. Um eine optimale Zellzahl zum Vergleich verschiedener Zelllinien definieren und kontrollieren zu können, ist der Endpunkt der 90-95%igen Konfluenz gut geeignet. Die Zellzahl, die nach dem 72stündigen MTT-Test in der Kontrolle zu einem 90-95 % konfluenten Zell-Monolayer heranwächst, ist für jede Zelllinie zu bestimmen und im MTT-Test einzusetzen. Dies wurde für alle in der Arbeit verwendeten Zelllinien durchgeführt.

Bestimmung der Cisplatin-Resistenz mittels MTT-Test

Die Cisplatin-resistente Subzelllinie Cal27res zeigt im Vergleich mit ihrer parentalen Zelllinie Cal27 10fache Resistenz gegenüber Cisplatin. Abbildung 4.3 zeigt repräsentative MTT-Ergebnisse aus dem Jahr 2004 mit einem Resistenzfaktor von $10,0 \pm 1,8$. Die pEC₅₀-Werte für Cal27 liegen bei $5,71 \pm 0,03$ und für Cal27res bei $4,71 \pm 0,07$. Diese Daten wurden kurz nach der Durchführung der SSH erhoben. Die MTT-Daten aus dem Jahr 2004 (siehe Abbildung 4.3) entsprechen den in Abbildung 4.4 dargestellten Daten aus dem Jahr 2006. Aus den neuen Daten ergeben sich pEC₅₀-Werte für Cal27

von $5,64 \pm 0,08$ und für Cal27res von $4,63 \pm 0,08$ und daraus ein Resistenzfaktor von $10,3 \pm 2,6$.

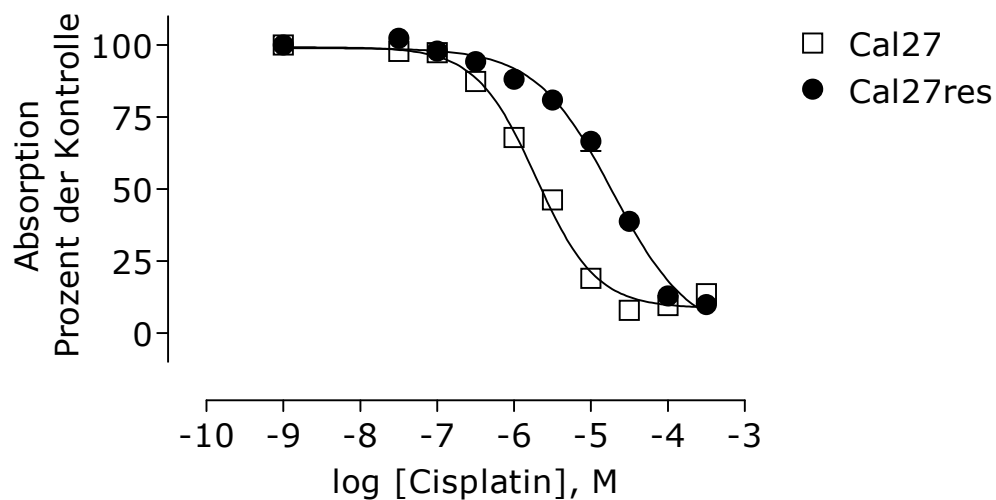


Abbildung 4.3: MTT-Tests der beiden Cal27-Zelllinien aus dem Jahr 2004 mit einem Resistenzfaktor von 10,0. Dargestellt sind die $MW \pm SE$ aus $n = 3$ mit je 3 Replikaten. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Cisplatin inkubiert, diese Werte sind darstellungsbedingt als Konzentration 10^{-9} M angegeben. Eine Normalisierung wurde durchgeführt, indem alle Absorptionen auf die Absorption der jeweiligen Kontrolle bezogen wurden.

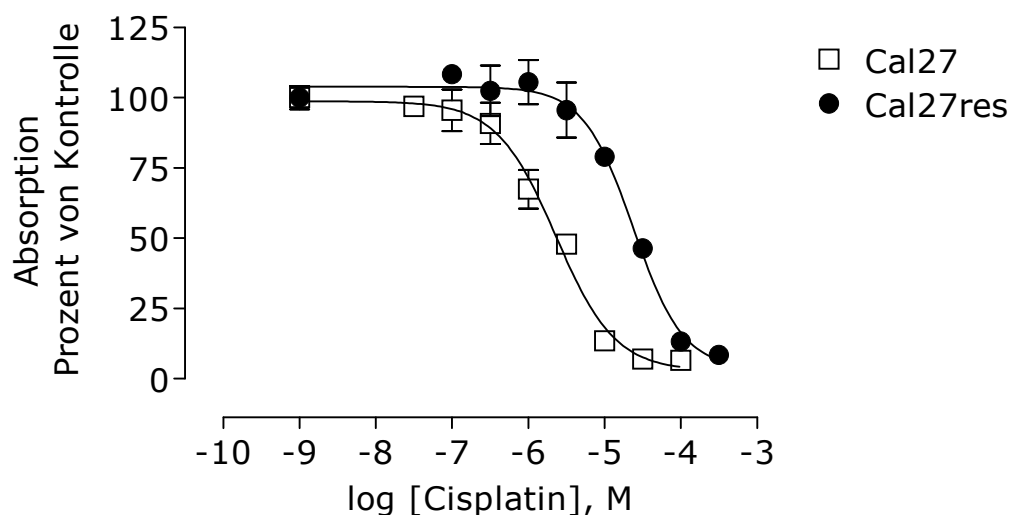


Abbildung 4.4: MTT-Tests der beiden Cal27-Zelllinien aus dem Jahr 2006 mit einem Resistenzfaktor von 10,3. Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit 3 Replikaten. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Cisplatin inkubiert, diese Werte sind darstellungsbedingt als Konzentration 10^{-9} M angegeben. Eine Normalisierung wurde durchgeführt, indem alle Absorptionen auf die Absorption der jeweiligen Kontrolle bezogen wurden.

4.1.3 BrdU-Test

Variationen der Zellzahl

Inwieweit unterschiedliche Ausgangszellzahlen einen Einfluss auf den BrdU-Test haben, wurde nur an den Cal27res-Zellen untersucht (siehe Abbildung 4.5). Dazu wurden 1 000, 2 000 und 3 000 Zellen pro Well ausgesäht, über Nacht anwachsen gelassen und für 70 h mit Cisplatin analog zum MTT-Test inkubiert. Aufgrund des geringen Unterschiedes zwischen 3 000 und 4 000 Zellen pro Well im MTT-Test (vergleiche Abbildung 4.2) wurden 4 000 Zellen pro Well im wesentlich teureren BrdU-Test nicht untersucht. Nach einer 2stündigen Inkubation mit BrdU wurde der ELISA entwickelt und es ergaben sich die in Abbildung 4.5 dargestellten Konzentrations-Effekt-Kurven. Analog zum MTT-Test erkennt man auch hier eine Zunahme der Absorption, also eine vermehrte BrdU-Inkorporation bei einer höheren Zellzahl. Eine Aussage über den Einfluss der Zellzahl auf den pEC_{50} -Wert erhält man auch hier durch einen paarweisen Vergleich zwischen den pEC_{50} -Werten nach Tukey. Die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

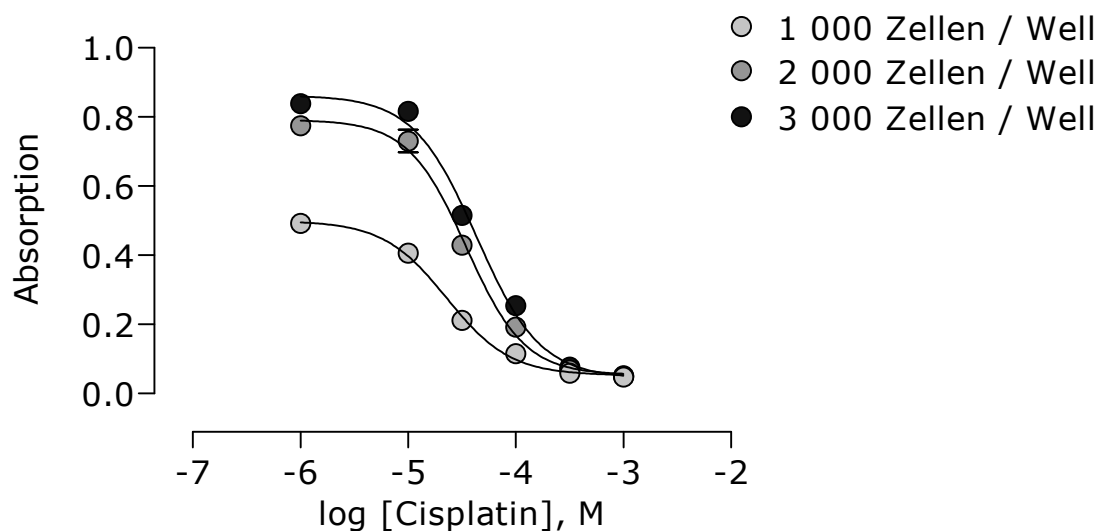


Abbildung 4.5: Vergleich unterschiedlicher Zelldichten von Cal27res im BrdU-Test. Dargestellt sind die $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit 3 Replikaten.

Die Auswirkung der unterschiedlichen Zellzahlen auf die entsprechenden pEC_{50} -Werte sind beim BrdU-Test deutlich ausgeprägter als beim MTT-Test. Es zeigt sich, dass ein signifikanter Unterschied mit $p < 0,05$ der pEC_{50} -Werte des BrdU-Tests mit 2 000 und 3 000 Zellen besteht. Der Unterschied zwischen den pEC_{50} -Werten des Tests mit 1 000 und 2 000 Zellen ist mit $p < 0,01$ noch deutlicher. Der Unterschied zwischen 1 000 und 3 000 Zellen ist hochsignifikant ($p < 0,001$).

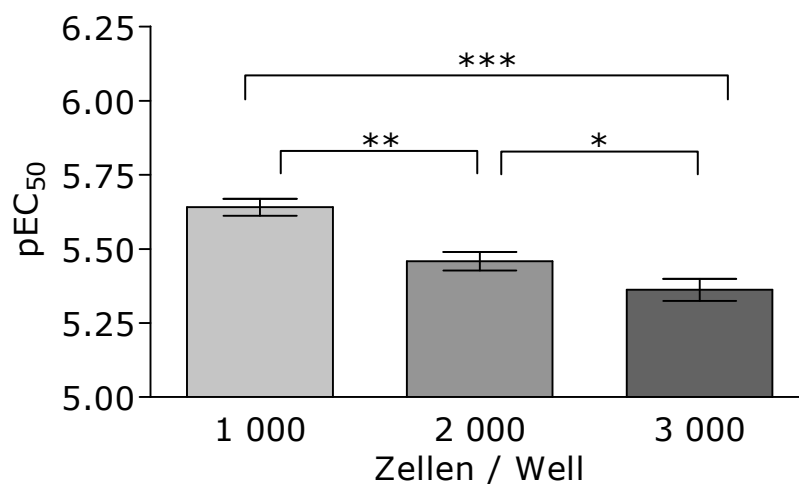


Abbildung 4.6: Vergleich der pEC_{50} -Werte des BrdU-Tests von Cal27res mit verschiedenen Zellzahlen mittels eines paarweisen Vergleichs nach Tukey (* = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und * = $p < 0,001$). Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit 3 Replikaten.**

Der Einfluss der Ausgangszellzahl auf die mittels BrdU-Test ermittelten pEC_{50} -Werte ist somit ausgeprägter als beim MTT-Test. Auch hier ist eine dem MTT-Test entsprechende Optimierung der Zellzahl (90-95%ige Konfluenz am Endpunkt des BrdU-Tests) für die Zelllinien durchzuführen und bei Versuchen exakt einzuhalten.

Ermittlung der Cisplatin-Resistenz mittels BrdU-Test

Beide Cal27-Zelllinien wurden neben dem MTT-Test auch mittels des BrdU-Tests auf ihre Resistenz gegenüber Cisplatin untersucht (siehe Abbildung 4.7). Die pEC_{50} -Werte für Cal27 liegen bei $5,86 \pm 0,11$ und für Cal27res bei

$4,84 \pm 0,09$. Daraus ergibt sich ein Resistenzfaktor zwischen Cal27 und Cal27res von $10,3 \pm 3,6$.

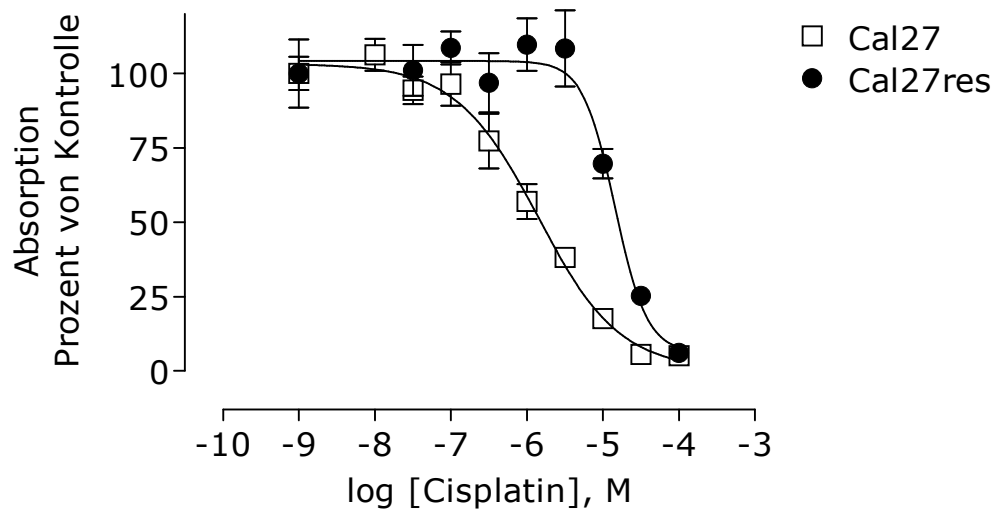


Abbildung 4.7: BrdU-Tests der beiden Cal27-Zelllinien. Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit 3 Replikaten. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Cisplatin inkubiert, diese Werte sind darstellungsbedingt als Konzentration 10^{-9} M angegeben. Eine Normalisierung wurde durchgeführt, indem alle Absorptionen auf die Absorption der jeweiligen Kontrolle bezogen wurden.

Bestimmung der Cisplatin-Resistenz mittels Sulforhodamin-Test

Prinzipiell ist auch die Anfärbung der Zellen mit Sulforhodamin als Zytotoxizitätstest anwendbar. Analog zum MTT-Test wurden beide Zelllinien Cal27 und Cal27res mit 4 000 Zellen pro Well ausgesäht und über Nacht anwachsen gelassen. Nach der Inkubation mit Cisplatin wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.4 beschrieben, mit Sulforhodamin angefärbt und lysiert. Die analog zum MTT-Test ausgewerteten Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 4.8 dargestellt. Mittels des Sulforhodamin-Test lagen die ermittelten pEC_{50} -Werte für Cal27 bei $5,53 \pm 0,05$ und für Cal27res bei $4,76 \pm 0,07$. Dies ergibt einen Resistenzfaktor von $5,8 \pm 1,2$.

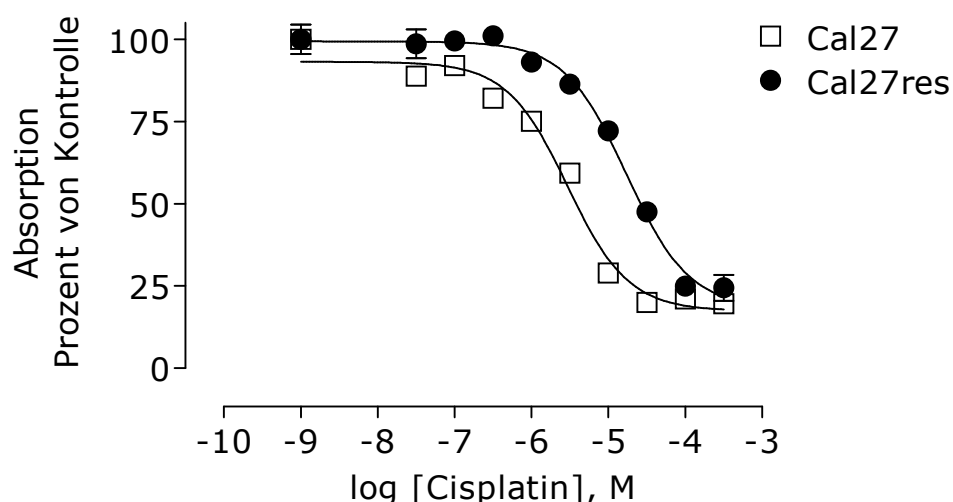


Abbildung 4.8: SRB-Test mit Cal27 und Cal27res. Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit 3 Replikaten. Als Kontrolle wurden die Zellen ohne Cisplatin inkubiert, diese Werte sind darstellungsbedingt als Konzentration 10^{-9} M angegeben. Eine Normalisierung wurde durchgeführt, indem alle Absorptionen auf die Absorption der jeweiligen Kontrolle bezogen wurden.

4.1.4 Zusammenfassung der MTT-, BrdU- und SRB-Daten

Bei einem Vergleich der verschiedenen Methoden und Ergebnisse zur Bestimmung der Resistenz von Cal27res im Verhältnis zu Cal27 ergaben sich die in Tabelle 4.1 wiedergegebenen Daten.

Tabelle 4.1: Vergleich der MTT-, BrdU- und SRB-Daten zur Cisplatin-Resistenz von Cal27 und Cal27res.

Test	Cal27 $pEC_{50} \pm SE$	Cal27res $pEC_{50} \pm SE$	Resistenzfaktor $\pm SE$
MTT 2004	$5,71 \pm 0,03$	$4,71 \pm 0,07$	$10,0 \pm 1,8$
MTT 2006	$5,64 \pm 0,08$	$4,63 \pm 0,08$	$10,3 \pm 2,6$
BrdU	$5,86 \pm 0,11$	$4,84 \pm 0,09$	$10,3 \pm 3,6$
SRB	$5,53 \pm 0,05$	$4,76 \pm 0,07$	$5,8 \pm 1,2$
Tukey	immer $p > 0,05$	immer $p > 0,05$	immer $p > 0,05$

Bei einem Vergleich aller Methoden ergeben sich weder für Cal27 noch für Cal27res nach Tukey signifikante Unterschiede der Konzentrations-Effekt-Kurven. Vergleicht man die für jede Methode aus den EC_{50} -Daten berechneten Resistenzfaktoren nach ANOVA und Tukey, ergeben sich auch hier keine signifikanten Unterschiede der ermittelten Resistenzfaktoren.

4.1.5 Cisplatin-Aufnahme

Für den Versuch, wie viel Cisplatin die beiden Zelllinien Cal27 und Cal27res aufnehmen, wurden pro Well einer 6-Well-Platte 500 000 Zellen ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Nach anschließend dreistündiger Inkubation mit 20 μ M Cisplatin ist die Menge an aufgenommenem Cisplatin beider Zelllinien nicht signifikant verschieden (siehe Abbildung 4.9). Auch nach sechsstündiger Inkubation ist nur eine Tendenz zu erkennen, dass die Cisplatin-resistente Zelllinie Cal27res etwa 1,3mal weniger Cisplatin aufgenommen hat als die sensitive Zelllinie Cal27. Der Unterschied zwischen Cal27 und Cal27res ist aber auch nach 6 h nicht signifikant ($p > 0,05$).

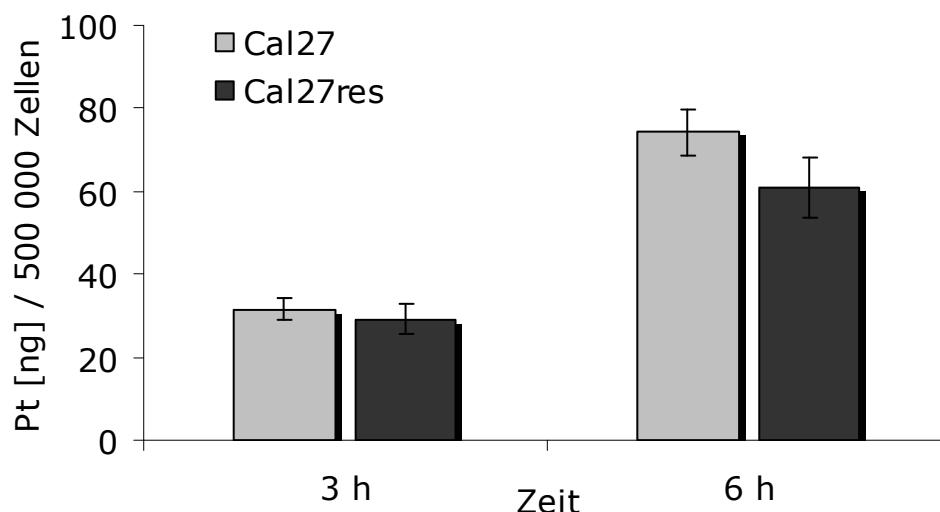


Abbildung 4.9: Cisplatin-Aufnahme der beiden Cal27-Zelllinien. Dargestellt sind $MW \pm SE$ aus $n = 1$ mit je 3 Replikaten.

4.2 Differentielle Genexpressionsanalyse von Cal27 und Cal27res

4.2.1 Eliminierung falsch-positiver Fragmente der SSH

Mirror orientation selection (MOS)

Um neue Kandidatengene, die einen Beitrag zur Cisplatinresistenz von Cal27res leisten, zu identifizieren, wurde eine Subtraktionshybridisierung durchgeführt. Diese suppressive subtraktive Hybridisierung (SSH) wurde in den letzten Jahren erfolgreich zur Identifizierung z. T. unbekannter differentiell exprimierter Gene zweier biologischer Organismen angewandt. Untersucht wurden dabei verschiedene biologische Proben im Hinblick auf unterschiedliche Fragestellungen.¹⁰⁷⁻¹⁰⁹ In Zeiten, in denen Mikroarrays immer erschwinglicher werden, nimmt der Anteil der Subtraktionshybridisierungen zur Untersuchung differentieller Genexpression immer mehr ab. Aber auch heute wird die SSH vor allem bei der Untersuchung von Organismen eingesetzt, deren Genomsequenzen noch nicht entschlüsselt sind. Denn im Gegensatz zum Mikroarray müssen die Sequenzen der differentiell exprimierten Gene nicht bekannt sein. Ein weiterer Vorteil der SSH ist, dass theoretisch eine Anreicherung von niedrig exprimierten Genen stattfindet, deren Unterschiede in der Genexpressionsanalyse mittels Mikroarray nur schwer signifikant detektiert werden können.

Nach der Subtraktionshybridisierung wurde die *Mirror orientation selection* (MOS) durchgeführt, um eine weitere Suppression von falsch-positiven Fragmenten (Typ-II-Hintergrund, siehe Kapitel 3.10.1) zu erzielen. Die PCR-Produkte beider SSH-Richtungen nach MOS wurden der Größe nach auf einem Polyacrylamidgel (siehe Kapitel 3.10.2) aufgetrennt. In der resistenten Probe konnten neun Banden und in der sensitiven Probe vier Banden aus dem Polyacrylamidgel ausgeschabt werden. Nach der Klonierung in *E. coli* zur Vereinzelung der Fragmente jeder Bande wurden die *E. coli*-Kolonien aufgekocht und mittels PCR analysiert. Anhand dieser PCR konnte entschieden werden, welche Klone der 960 selektierten *E. coli*-Kolonien den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor mit einem MOS-positiven Fragment

trugen, das gekennzeichnet war durch zwei NP2Rs-Primerbindungsstellen und damit exponentiell amplifiziert werden konnte. Abbildung 4.10 zeigt ein typisches Gel, auf dem fünf von acht Proben (Bande 1 bis 4 und Bande 8) MOS-positiv sind, also mittels NP2Rs-Primern aus dem Vektor amplifiziert werden konnten.

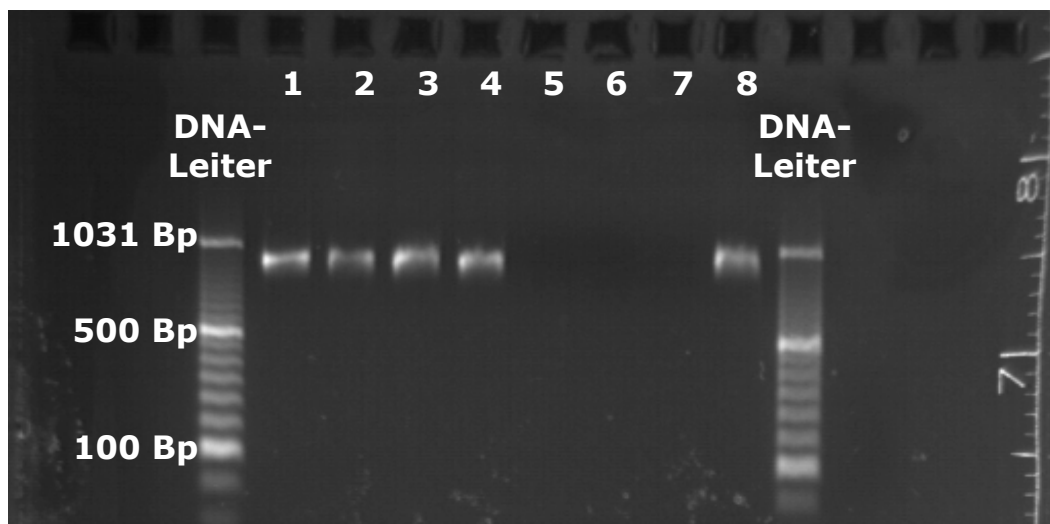


Abbildung 4.10: Typisches 2%iges Agarosegel der PCR-Produkte nach der *Mirror Orientation Selection*. Die Banden 1 bis 4 und 8 zeigen MOS-positive PCR-Produkte, die im folgenden Differentiellen Screening weiter untersucht worden sind.

Differentielles Screening mit Sonden aus subtrahierter cDNA

375 PCR-Produkte, amplifiziert mit NP2Rs-Primern, zeigten eine Bande auf den Agarosegelen (sie waren MOS-positiv) und konnten danach mittels Differentiellem Screening zur Eliminierung des Typ-I-Hintergrundes weiter untersucht werden. Dazu wurden die PCR-Produkte der positiven Fragmente parallel auf zwei Nylonmembranen geblottet und mit Sonden aus der cDNA hybridisiert (siehe Kapitel 3.10.4). Bei der Kontrolle der Markierungseffizienz (siehe Kapitel 3.10.4) waren die generierten Sonden nicht verschieden. Die ersten Dot-Blots der 375 PCR-Produkte erlaubten den Ausschluss von etwa 260 falsch-positiven PCR-Produkten. Die verbleibenden positiven PCR-Produkte wurden auf zwei weiteren Dot-Blots erneut zusammen verglichen. Diese beiden Dot-Blots, hybridisiert mit resistenter bzw. sensibler Sonde, sind in Abbildung 4.11 gezeigt.

In der resistenten Probe überexprimierte Sequenzen zeigen ein stärkeres Signal, wenn sie mit der Sonde aus resistenter cDNA hybridisiert werden, als wenn sie mit der Sonde aus sensitiver cDNA hybridisiert werden. Entsprechendes gilt für die in der sensitiven Probe vorhandenen Sequenzen, die mit der sensitiven Sonde das stärkere Signal geben. Blots, die zwischen sensitiver und resistenter Sonde ein differentielles Signal ergaben und aus jeder Bande stichprobenartig für die Sequenzierung ausgewählt wurden, sind in Abbildung 4.11 umrandet dargestellt.

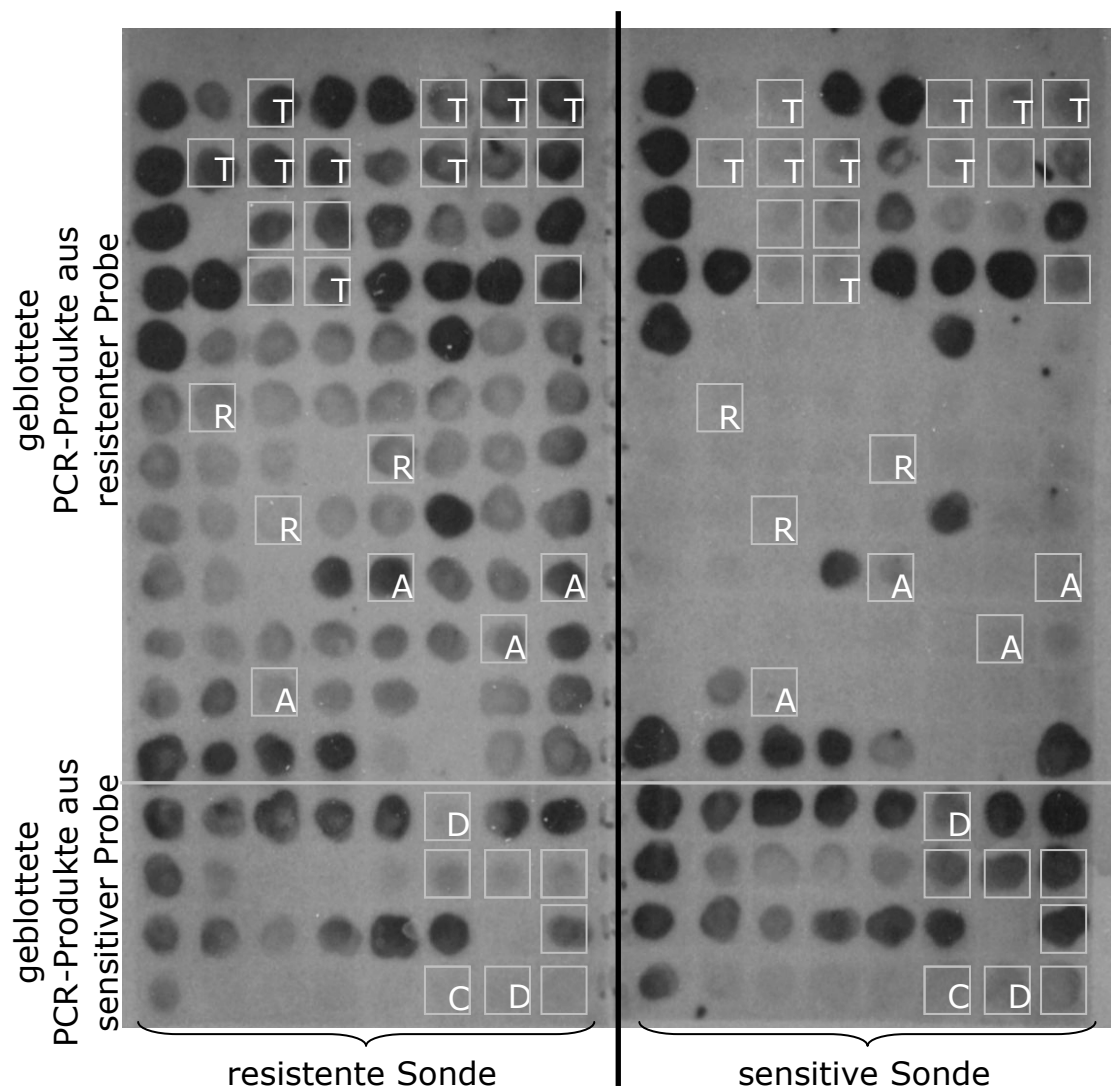


Abbildung 4.11: Dot-Blots der MOS-PCR-Produkte hybridisiert mit resistenter (links) bzw. sensitiver Sonde (rechts); sequenzierte Produkte sind durch Quadrate markiert und die Sequenzierungsergebnisse mit Hilfe von Buchstaben gezeigt: T = THBS1, R = RPL5, A = AKR1B1, D = DKK1 und C = CSTA. PCR-Produkte nicht bezeichneter Quadrate ergaben ein nicht auswertbares Sequenzierungsergebnis oder Vektor-DNA.

Differentielles Screening mit Sonden aus unsubtrahierter cDNA

Für Abbildung 4.12 A und B wurden dieselben Blots mit Fragmenten einer Bande (in Kapitel 3.10.4 beschrieben) zuerst mit der sensitiven oder resistenten Sonde aus subtrahierter cDNA hybridisiert (A). Nach dem Entfernen der Sonden von den Blots (siehe Seite 132) wurden diese mit sensibler und resistenter Sonde aus unsubtrahierter cDNA hybridisiert (B). Diese Hybridisierung mit Sonden aus unsubtrahierter cDNA war nicht auszuwerten, nur zwei PCR-Produkte zeigten auswertbare, aber identische Signale auf beiden Blots. Auf beiden Blots erscheinende Signale sind Fragmente, die schon vor der Subtraktion und der PCR-Amplifikation während der SSH in ausreichender Konzentration vorlagen, um bei dieser Hybridisierung ein Signal hervorbringen zu können.

Auch weitere Blots mit geblotteten Fragmenten einer zweiten Bande ergaben ein ähnliches Ergebnis (nicht gezeigt), so dass im Folgenden das Differentielle Screening nur mit den Sonden aus subtrahierter cDNA durchgeführt worden ist.

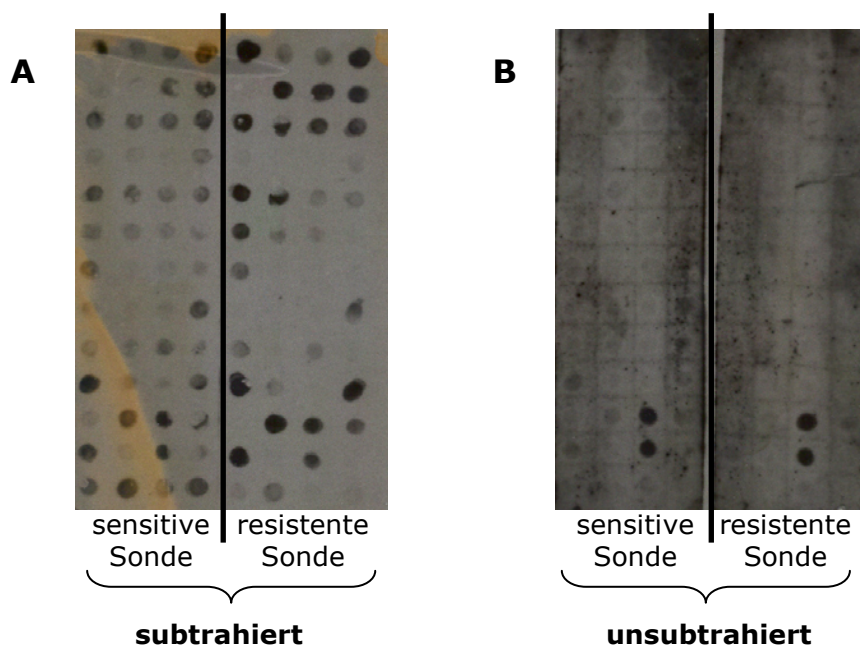


Abbildung 4.12: Vergleich der Dot-Blots, die beide geblottete PCR-Produkten der resistenten Probe besitzen. Hybridisiert wurde mit resistenter oder sensibler Sonde aus subtrahierter cDNA (A) oder mit Sonde aus unsubtrahierter cDNA (B).

4.2.2 Sequenziererergebnisse

Die in Abbildung 4.11 markierten PCR-Produkte wurden sequenziert und die Sequenz mittels BLAST Genen zugeordnet. Die Sequenzen entsprechen den in Tabelle 4.2 angegebenen Genen.

Tabelle 4.2: Sequenziererergebnisse.

überexprimiert in	Anzahl	Ergebnis
Cal27res	9	THBS1
	3	RPL5
	4	AKR1B1
	6	nicht auswertbar bzw. Vektor in resistenter Probe
Cal27	2	DKK1
	1	CSTA
	3	nicht auswertbar bzw. Vektor in sensibler Probe

Informationen zu diesen Genen sind im Folgenden aufgezeigt. Die Funktionen der Gene und ihre eventuelle Rolle bezüglich der Resistenz der Zelle gegenüber Cisplatin werden in der Diskussion erörtert.

Thrombospondin 1 (THBS1)

Accession-Nummer: NM_003246
 Locus ID: 7057
 alternative Symbole: TSP, THBS, TSP1

Ribosomales Protein 5 (RPL5)

Accession-Nummer: NM_00969
 Locus ID: 6125
 alternative Symbole: MSTP030

Aldo-Keto-Reduktase 1, Mitglied 1 (AKR1B1)

Accession-Nummer: NM_001628
 Locus ID: 231

Alias : Aldose-Reduktase, Aldehyd-Reduktase
1, low-Km-Aldose-Reduktase, Lii5-2
CTCL tumor antigen
alternative Symbole: AR, ADR, ALDR1, MGC1804

Dickkopf Homolog 1 (DKK1)

Accession-Nummer: NM_012242
Locus ID: 22943
alternative Symbole: DKK-1, SK

Cystatin A (CSTA)

Accession-Nummer: NM_005213
Locus ID: 1475
Alias: Stefin A
alternative Symbole: STF1, STFA

Aus den 960 selektierten E. coli-Klonen wurden schließlich fünf Gene erhalten, die als Kandidaten für differentiell exprimierte Gene zwischen der sensitiven und resistenten Cal27-Zelllinie zur Verfügung stehen. Einen Gesamtüberblick über die Reduktion vom Selektieren der Kolonien auf Agar bis zur Sequenzierung der Fragmente und ihrer Bestätigung mittels qRT-PCR gibt Tabelle 4.3.

Tabelle 4.3: Reduktion anfallender Kandidaten vom Klonieren bis zu den Ergebnissen der Sequenzierung, die Kandidatengene lieferte und deren Bestätigung in der qRT-PCR.

sensitive Zelllinie	Schritt	resistente Zelllinie
360	selektierte Kolonien nach der Klonierung	600
89	MOS-positive Proben auf den Agarosegelen	286
32	positive Proben im Differentiellen Screening	77
6	sequenziert	22
2	Kandidatengene	3
2	qRT-PCR-Bestätigung	1

4.2.3 qRT-PCR-Bestätigung der Kandidatengene

Da die SSH nur einen Hinweis auf eine eventuelle differentielle Expression der Kandidatengene gibt, wurde das Verhältnis der Expression der ermittelten Kandidatengene in den mRNA-Proben von Cal27 und Cal27res, die Ausgangsmaterial für die SSH waren, untersucht (siehe Abbildung 4.13). Die Überexpressionen von CSTA (Faktor 5,6) und DKK1 (Faktor 1,5) in der sensitiven Zelllinie Cal27 und die Überexpression von AKR1B1 (Faktor 2,3) in der resistenten Zelllinie Cal27res konnten bestätigt werden. RPL5 zeigt keine differentielle Expression und THBS1 ist in der sensitiven Zelllinie Cal27 2,1fach stärker exprimiert als in der resistenten Zelllinie Cal27res. Dies entspricht nicht der Richtung der SSH, bei den Sequenzierungsergebnissen erschien THBS1 als in Cal27res überexprimiert.

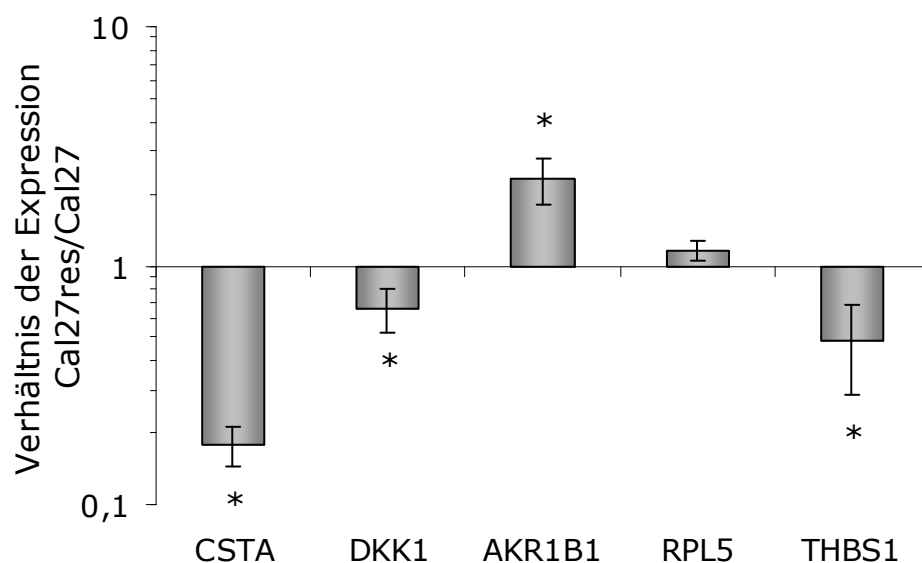


Abbildung 4.13: qRT-PCR-Bestätigung der differentiellen Expression der mittels SSH ermittelten Kandidatengene. * = signifikanter Unterschied zwischen Cal27 und Cal27res ($p < 0,05$). Gezeigt sind MW \pm SD aus $n = 3$.

MOS in Kombination mit dem differentiellen Screening scheint einen Großteil der falsch-positiven Klone, die während der SSH entstanden sind, eliminiert zu haben. Auch der durchgeführte Mikroarray bestätigte die differentielle Genexpression der identifizierten Gene bis auf die des Gens

RPL5 (siehe Tabelle 4.4). Jedoch sind die Ergebnisse der qRT-PCR zur Bestätigung der SSH-Kandidatengene nicht direkt mit den Mikroarray-Ergebnisse vergleichbar: Die **SSH** wurde nach Behandlung der Zellen mit **10 µM Cisplatin** durchgeführt, im **Mikroarray** wurden **unbehandelte** Zellen untersucht.

In Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der qRT-PCR Bestätigung der SSH mit den Expressionswerten dieser Gene im Mikroarray verglichen. Von den fünf mittels SSH identifizierten Genen zeigen auch im Mikroarray vier eine differentielle Expression, davon drei in der zur SSH identischen Richtung: AKR1B1, CSTA und DKK1. THBS1 wird als in der Zelllinie Cal27 signifikant überexprimiert detektiert. Dieses Ergebnis entspricht jedoch der qRT-PCR-Bestätigung (siehe Tabelle 4.4). Ebenfalls ist anzumerken, dass CSTA eines der Gene im Mikroarray ist, das mit am stärksten in der Zelllinie Cal27 überexprimiert ist.

Tabelle 4.4: Vergleich der SSH-Bestätigung mittels qRT-PCR der in der SSH ermittelten Gene mit den Array-Ergebnissen. Eine positive Zahl der Array- und SSH-Ergebnisse bedeutet eine Überexpression in Cal27res, eine negative eine Überexpression in Cal27. Alle angegebenen Expressionsverhältnisse sind mit $p < 0,05$ signifikant.

Gen	Array	SSH- Bestätigung qRT-PCR	Überein- stimmung
AKR1B1	2,41	2,31	ja
CSTA	-11,4	-5,62	ja
DKK1	-1,61	-1,51	ja
RPL5	-	-	ja
THBS1	-1,34	-2,06	ja

4.3 Evaluierung der Kandidatengene und weiterer interessanter Gene an weiteren Zelllinien

4.3.1 Ermittlung der Cisplatin-Resistenz verschiedener Zelllinien

Die mittels SSH identifizierten Kandidatengene AKR1B1, CSTA, DKK1, RPL5 und THBS1 konnten in der qRT-PCR teilweise als differentiell exprimiert bestätigt werden (vergleiche Abbildung 4.13). Um einen weiteren Einblick zu erhalten, ob und welche Rolle diese Gene im Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz spielen, wurde ihre Expression und die Expression von weiteren interessanten Genen (AKR1C1/2, CTSB, EGR1 und p53) auf Cisplatin-Stress in 18 verschiedenen Zelllinien untersucht. Für die SSH wurden beide Cal27-Zelllinien mit therapeutischen Cisplatinkonzentrationen von 10 μM für 24 h behandelt. Nach einer Auswaschphase von 3 h wurde die RNA für die SSH isoliert. Um jedoch die differentielle Expression von den 18 verschiedenen Zelllinien besser vergleichen zu können, wurden die Cisplatinkonzentrationen für die Cisplatinbehandlung der Zelllinien an ihren jeweiligen Resistenzgrad angepasst. Dazu wurden zuerst mittels MTT-Test die pEC_{50} -Werte der Zelllinien bestimmt, die in Tabelle 4.5 zusammengefasst sind. Die dieser Tabelle zugrunde liegenden Kurven sind im Anhang in Kapitel 12.2 dargestellt. Tabelle 4.5 gibt ebenfalls die für die folgende Untersuchung der Genexpression verwendete Cisplatin-Konzentration für jede Zelllinie an, die etwa einer zweifachen EC_{50} -Konzentration entspricht.

Tabelle 4.5: Übersicht über die mittels MTT-Test ermittelten pEC_{50} -Werte der verschiedenen Zelllinien und die für die Genexpressionsstudie zur Behandlung der Zellen verwendeten Cisplatin-Konzentrationen. pEC_{50} -Werte sind MW \pm SE aus $n \geq 3$ mit je 3 Replikaten.

Zelllinie	$\text{pEC}_{50} \pm \text{SE}$	Cisplatin-Konzentration [μM]
Kyse510	$5,88 \pm 0,03$	2,5
1321N1	$5,74 \pm 0,07$	2,8
Cal27	$5,71 \pm 0,03$	4
DU145	$5,66 \pm 0,05$	4

Zelllinie	pEC₅₀ ± SE	Cisplatin-Konzentration [µM]
A2780	5,60 ± 0,08	5
U937	5,56 ± 0,06	4
HepG2	5,55 ± 0,05	5
Hek293	5,52 ± 0,07	8
2102KLE	5,51 ± 0,05	6
2102	5,28 ± 0,04	8
T24	5,10 ± 0,05	12
MCF7	5,06 ± 0,09	8
NW1539	4,93 ± 0,07	15
A2780cis	4,91 ± 0,07	20
K562	4,91 ± 0,06	9
HT29	4,90 ± 0,05	30
Caco2	4,83 ± 0,08	25
Cal27res	4,71 ± 0,07	40

Die einzelnen Konzentrations-Effekt-Kurven sind im Anhang in Kapitel 12.2 dargestellt. Die resistensteste Zelllinie ist Cal27res, sie ist 14,6fach resistenter als die sensitivste Zelllinie Kyse510. Kyse510 ist wie Cal27 eine Kopf-Hals-Zelllinie. Für das Zellpärchen A2780/A2780cis ergibt sich ein Resistenzfaktor von $4,98 \pm 1,25$ und für Cal27/Cal27res ein Resistenzfaktor von $9,99 \pm 1,90$.

Die ermittelten pEC₅₀-Werte für alle untersuchten Zelllinien sind für einen besseren Überblick erneut in Abbildung 4.14 dargestellt. Die Zelllinien lassen sich in zwei große, jeweils neun Zelllinien umfassende Gruppen unterteilen: Die sensitivere Gruppe besitzt pEC₅₀-Werte größer 5,5, die resistenstere Gruppe kleiner 5,3.

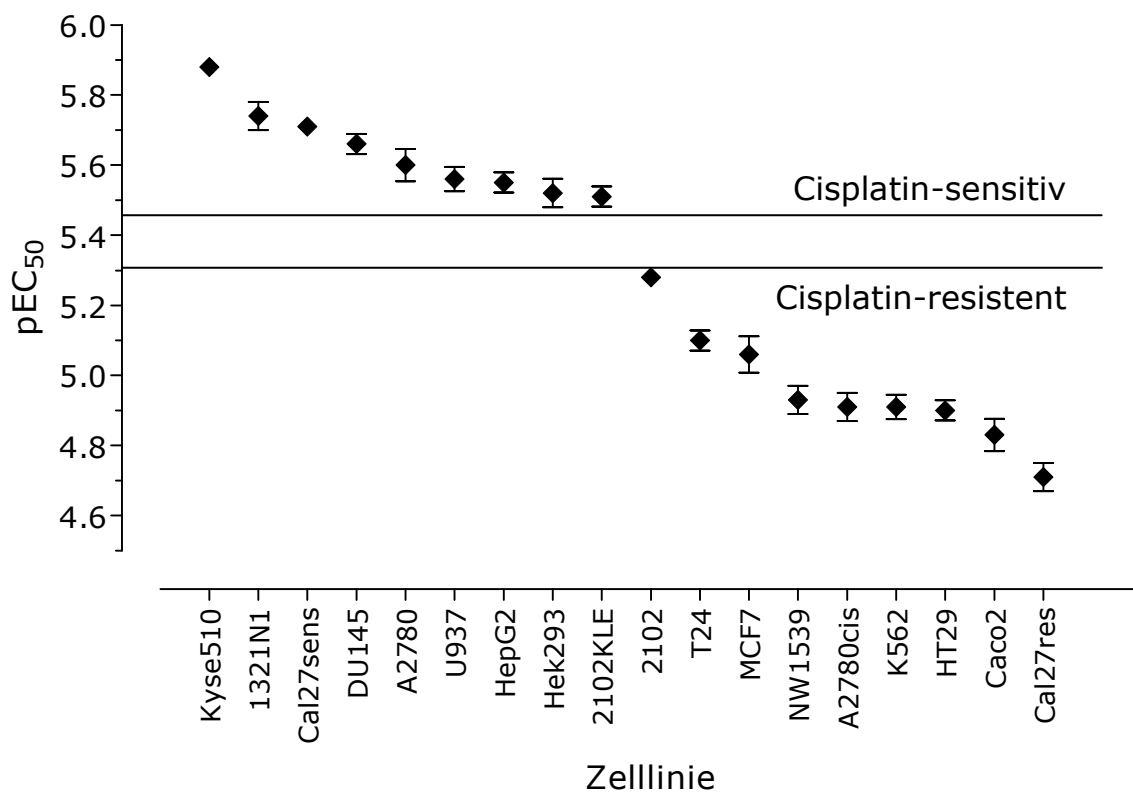


Abbildung 4.14: pEC_{50} -MW \pm SE der 18 Zelllinien, ermittelt mittels MTT-Test und sortiert nach dem Resistenzgrad.

4.3.2 Expression der durch SSH identifizierte Kandidatengene und weiterer interessanter Gene in verschiedenen Zelllinien

I Überprüfung der PCR-Effizienzen

Für vier ausgewählte Gene wurden Standardkurven aus **aufgereinigtem** Template ermittelt. Als Template wurden die entsprechenden PCR-Produkte eines jeden Genes auf einem Agarosegel aufgereinigt. Die erhaltene cDNA wurde mittels Pico-Green quantifiziert (siehe Kapitel 3.7.4) und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Diese diente als Template für die folgenden PCR-Läufe.

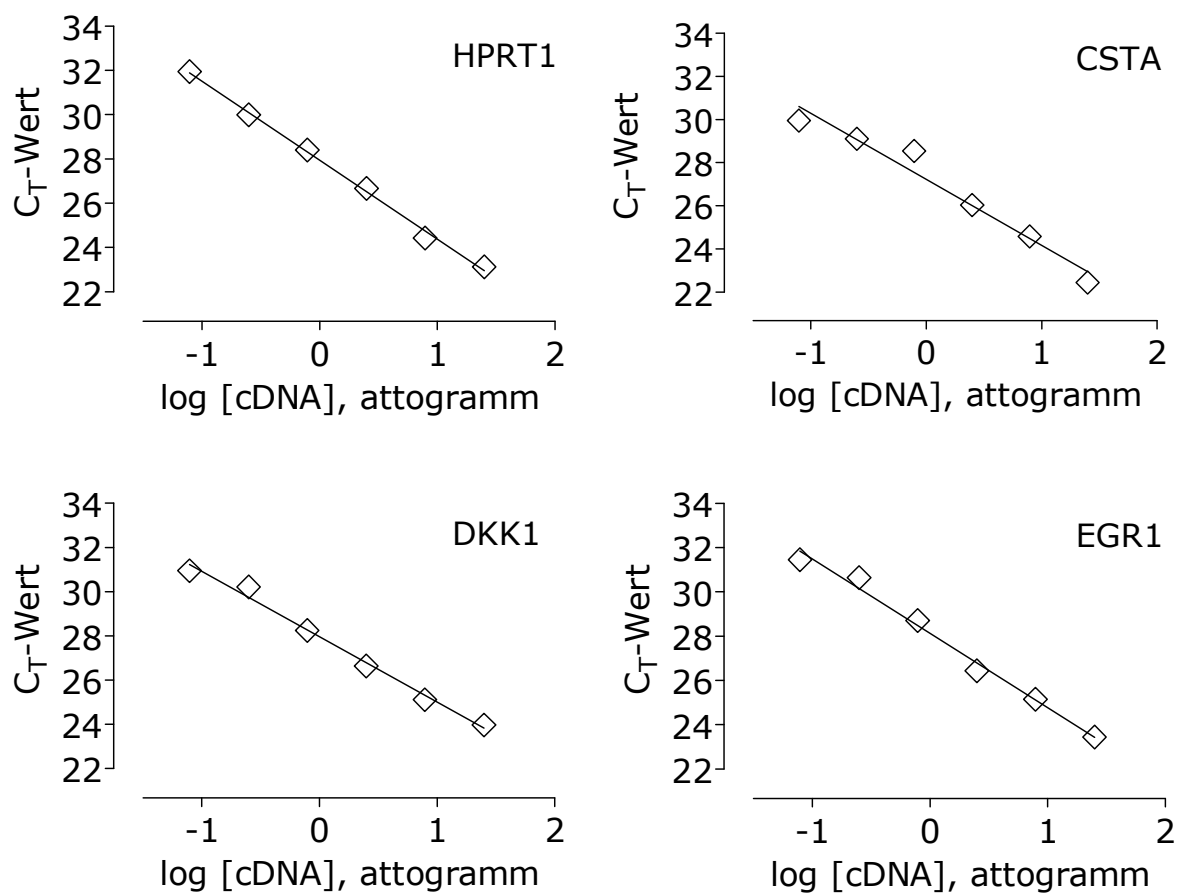


Abbildung 4.15: Standardkurven für HPRT1, DKK1, CSTA und EGR1.

Die PCR wurde bei einer Annealingtemperatur von 57 °C über 35 Zyklen durchgeführt. Für die Auswertung wurden die ermittelten C_T-Werte gegen die Menge der cDNA im Template aufgetragen und von den so erhaltenen Geraden für jedes Gen die Steigungen ermittelt. Alle Steigungen der ermittelten Standardkurven (siehe Abbildung 4.15) liegen im akzeptablen Bereich von $-3,3 \pm 0,3$ (siehe Tabelle 4.6). Die 95%-Konfidenzintervalle der entsprechenden Effizienzen schließen 100 % Effizienz mit ein, so dass alle Primer mit den PCR-Bedingungen für die quantitative PCR geeignet sind.

Tabelle 4.6: cDNA-Menge und C_T-Werte von vier mittels PCR untersuchten Genen nach Aufreinigung und Quantifizierung des eingesetzten Templates.

cDNA, attogramm	log [cDNA], attogramm	C _T -Werte			
		HPRT1	CSTA	DKK1	EGR1
25	1,398	23,12	22,45	23,98	23,45
7,9	0,898	24,43	24,58	25,11	25,15
2,5	0,398	26,68	26,04	26,64	26,43
0,79	-0,102	28,40	28,55	28,25	28,71
0,25	-0,602	29,99	29,10	30,22	30,65
0,079	-1,102	31,95	29,96	30,95	31,45
Steigung		-3,574 ± 0,100	-3,064 ± 0,310	-2,958 ± 0,148	-3,358 ± 0,182
95%-Konfidenzintervall		-3,852 bis -3,297	-3,925 bis -2,203	-3,368 bis -2,549	-3,863 bis -2,853
Effizienz		90 %	112 %	118 %	99 %
95%-Konfidenzintervall		82 % bis 101 %	80 % bis 184 %	98 % bis 146 %	81 % bis 124 %

Für alle anderen verwendeten Gene wurde im Folgenden nur eine Standardkurve aus einer Verdünnungsreihe aus **nicht aufgereinigtem** Template hergestellt. Die bereits betrachteten Gene wurden bis auf EGR1 erneut untersucht. Dabei ergab sich für HPRT1 ein 95%-KI_{Effizienz} von 84 bis 119 %, mit aufgereinigtem Template lag es bei 82 bis 101 %, also in einem vergleichbaren Bereich. Für CSTA ergab sich ein 95%-KI_{Effizienz} von 73 bis 115 %, was etwa dem unteren Bereich des zuvor ermittelten 95%-KI_{Effizienz} von 80 bis 184 % entspricht. Für DKK1 waren die ermittelten 95%-KI_{Effizienz} nur in einem kleinen Bereich deckungsgleich. Für das aufgereinigte Template wurde ein 95%-KI_{Effizienz} von 98 bis 146 % ermittelt, mit unaufgereinigtem Template ein 95%-KI_{Effizienz} von 82 bis 112 %. In allen drei Fällen waren die 95%-KI_{Effizienz} von aufgereinigtem und unaufgereinigtem Template überlappend. Mit der Untersuchung der Effizienzen an aufgereinigtem Template (d. h. dass **nur** die zu amplifizierende Sequenz isoliert eingesetzt wird) erkennt man, dass die Primer in der Lage sind, ein Template mit einer ausreichenden Effizienz zu amplifizieren. Die Untersuchung der Effizienz an unaufgereinigtem Template hat den Vorteil, dass

auch Beeinflussungen der Effizienz durch das Template selber eingehen (d. h. durch die anderen in dem Template vorhandenen Sequenzen, die unter Umständen Interaktionen mit den Primern eingehen können). Die Ergebnisse der Versuche mit unaufgereinigtem Template sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Die Effizienzen wurden jedoch nicht mit allen zu untersuchenden 36 cDNA-Proben der 18 Zelllinien durchgeführt, sondern nur mit der cDNA von Cal27.

Tabelle 4.7: Steigungen der Standardkurven mit 95%-Konfidenzintervallen für Steigung und Effizienz der PCR-Primerpaare aller untersuchten Gene mit nicht aufgereinigtem Template aus Cal27-Zellen.

	Gen	Steigung	95 %-KI_{Steigung}	95 %-KI_{Effizienz}
HKG	ACTB	$-3,417 \pm 0,161$	-3,811 bis -3,022	83 % bis 114 %
	B2M	$-3,429 \pm 0,114$	-3,702 bis -3,156	86 % bis 107 %
	GUSB	$-3,333 \pm 0,160$	-3,744 bis -2,922	85 % bis 120 %
	HPRT1	$-3,446 \pm 0,124$	-3,765 bis -3,127	84 % bis 109 %
	PhosA2	$-3,380 \pm 0,169$	-3,794 bis -2,966	83 % bis 117 %
	RPL13A	$-3,029 \pm 0,162$	-3,425 bis -2,623	96 % bis 140 %
	RPLP0	$-3,452 \pm 0,160$	-3,842 bis -3,062	82 % bis 112 %
	TFR	$-3,454 \pm 0,133$	-3,780 bis -3,129	84 % bis 109 %
	UBE2D2	$-3,089 \pm 0,129$	-3,429 bis -2,749	96 % bis 131 %
GOI	AKR1B1	$-3,235 \pm 0,133$	-3,559 bis -2,911	91 % bis 121 %
	AKR1C1/2	$-3,576 \pm 0,132$	-3,899 bis -3,252	80 % bis 103 %
	DKK1	$-3,447 \pm 0,155$	-3,829 bis -3,067	82 % bis 112 %
	CSTA	$-2,590 \pm 0,209$	-4,177 bis -3,010	73 % bis 115 %
	CTSB	$-3,582 \pm 0,109$	-3,848 bis -3,316	82 % bis 100 %
	p53	$-3,576 \pm 0,095$	-3,809 bis -3,343	83 % bis 99 %
	RPL5	$-3,639 \pm 0,094$	-3,880 bis -3,398	81 % bis 97 %
	THBS1	$-3,572 \pm 0,020$	-3,552 bis -3,592	90 % bis 91 %

Die 95 %-KI_{Effizienz} schließen für die Gene p53, RPL5, THBS1 die 100 % nicht mit ein. Dennoch wird in der folgenden Auswertung von einer 100%igen Effizienz für alle Gene ausgegangen, da nicht geklärt ist, ob diese geminderten Effizienzen auf alle Templates zutreffen. Ebenso würden sich die ermittelten Faktoren der Expressionsänderung nur unwesentlich verändern.

II Auswertung der PCR-Ergebnisse mittels geNorm

Bestimmung der *Housekeeping*-Gene

Die Auswertung von qRT-PCR-Experimenten ist mangels einer zuverlässigen Standardisierung schwierig. Vandesompele et al. schlagen die in Kapitel 3.11.3 vorgestellte Methode namens **geNorm** vor, bei der aus einem Set von potentiellen *Housekeeping*-Genen (HKGs) für die auszuwertenden Proben unter den durchgeführten Bedingungen die Gene zur Standardisierung ausgewählt werden, die untereinander die stabilste Expression aufweisen.⁸²

Für diese Genexpressionsstudie an 18 Zelllinien wurden die Zelllinien mit ihrer 1-2fachen EC_{50} von Cisplatin behandelt, gefolgt von einer 48stündigen Auswaschphase in Cisplatin-freiem Nährmedium. Dann wurde die Isolierung der RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNAs dienten als Template für die folgend durchgeführten qRT-PCR-Läufe jeder Probe mit neun *Housekeeping*-Genen (HKGs) und den neun *Genes of interest* (GOIs). Die GOIs setzen sich aus den Kandidatengenen der SSH (AKR1B1, CSTA, DKK1, RPL5 und THBS1) und den weiteren interessanten Genen AKR1C1/2, CTSC, EGR1 und p53 zusammen. Da nach der Reversen Transkription eine Quantifizierung der Templates nicht mehr möglich ist und in der PCR kein Standard zugesetzt werden kann, wurden im Folgenden die HKGs für jede Zelllinie (Vergleich unbehandelt mit Cisplatin-behandelt) nach geNorm bestimmt. Aus den in der qRT-PCR ermittelten C_T -Werten wurden die in Tabelle 4.8 dargestellten *Quantities* pro Zellpaar errechnet (vergleiche Kapitel 3.11.3). Mit deren Hilfe wurden pro Zellpaar drei HKGs bestimmt (siehe Kapitel 3.11.3), deren *Quantities* in Tabelle 4.8 fett gedruckt dargestellt sind.

Tabelle 4.8: Überblick über die mittels GeNorm ermittelten *Quantities* der Zelllinien-Paare (Cisplatin - = unbehandelte Kontrolle, Cisplatin + = mit Cisplatin behandelte Probe). Die *Quantities* der drei jeweiligen *Housekeeping*-Gene sind fett gedruckt.

Zelllinie	Cisplatin	B2M	ACTB	HPRT1	RPLP0	UBE2D2	GUSB	TFR	RPL13	PhosA2
1321N1	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	0,73	0,26	0,53	0,45	0,84	0,99	0,83	0,70	0,43
2102	-	0,85	0,97	1,00	1,00	1,00	0,97	1,00	1,00	1,00
	+	1,00	1,00	0,50	0,61	0,71	1,00	0,37	0,67	0,84
2102KLE	-	0,69	0,74	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,38
	+	1,00	1,00	0,42	0,31	0,64	0,66	0,54	0,76	1,00
A2780	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,19	1,00	1,00	1,00
	+	0,74	0,36	0,92	0,29	0,52	1,00	0,64	0,55	0,43
A2780cis	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	0,61	0,39	0,15	0,56	0,40	0,67	0,21	0,65	0,27
Caco2	-	0,82	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	1,00	0,91	0,51	0,76	0,68	0,92	0,43	0,63	0,62
Cal27	-	1,00	0,81	0,81	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	0,93	1,00	1,00	0,49	0,24	0,51	0,83	0,32	0,60
Cal27res	-	0,33	1,00	1,00	0,95	0,50	0,97	1,00	0,98	1,00
	+	1,00	0,87	0,97	1,00	1,00	1,00	0,87	1,00	0,84
DU145	-	0,46	0,88	1,00	1,00	0,65	0,46	0,83	0,14	1,00
	+	1,00	1,00	0,51	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	0,73
Hek293	-	0,74	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,89	1,00	1,00
	+	1,00	0,74	0,96	0,93	0,98	0,69	1,00	0,66	0,76
HepG2	-	0,85	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	1,00	0,29	0,37	0,31	0,53	0,69	0,52	0,30	0,46
HT29	-	0,15	0,58	0,45	1,00	0,45	0,37	0,42	1,00	0,58
	+	1,00	1,00	1,00	0,74	1,00	1,00	1,00	0,58	1,00
K562	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	0,69	0,37	0,32	0,33	0,45	0,79	0,66	0,30	0,36
Kyse510	-	1,00	0,48	0,46	0,88	0,74	0,90	0,60	1,00	0,61
	+	0,88	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,68	1,00
MCF7	-	1,00	0,91	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	+	0,61	1,00	0,27	0,62	0,57	0,53	0,43	0,78	0,88
NM1539	-	1,00	0,40	0,35	0,55	0,61	0,55	0,48	1,00	0,46
	+	0,60	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,97	1,00
T24	-	0,48	1,00	0,48	0,79	0,44	0,34	0,31	1,00	1,00
	+	1,00	0,99	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,79	0,67
U937	-	0,21	0,27	0,92	1,00	0,93	0,26	0,57	0,07	0,32
	+	1,00	1,00	1,00	0,52	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Aus dieser Übersicht ergibt sich die in Abbildung 4.16 dargestellte Verteilung der Housekeeping-Gene. Die prozentuale Verteilung ergibt in der Summe 300 %, da pro Zelllinie drei *Housekeeping*-Gene bestimmt worden sind. Bemerkenswert ist, dass das oft als HKG verwendete ACTB nur in zwei der 18 Zelllinien nach dieser Auswertung als HKG zu verwenden ist. Das kaum eingesetzte UBE2D2 ist für zehn der 18 Zellpaare ein HKG.

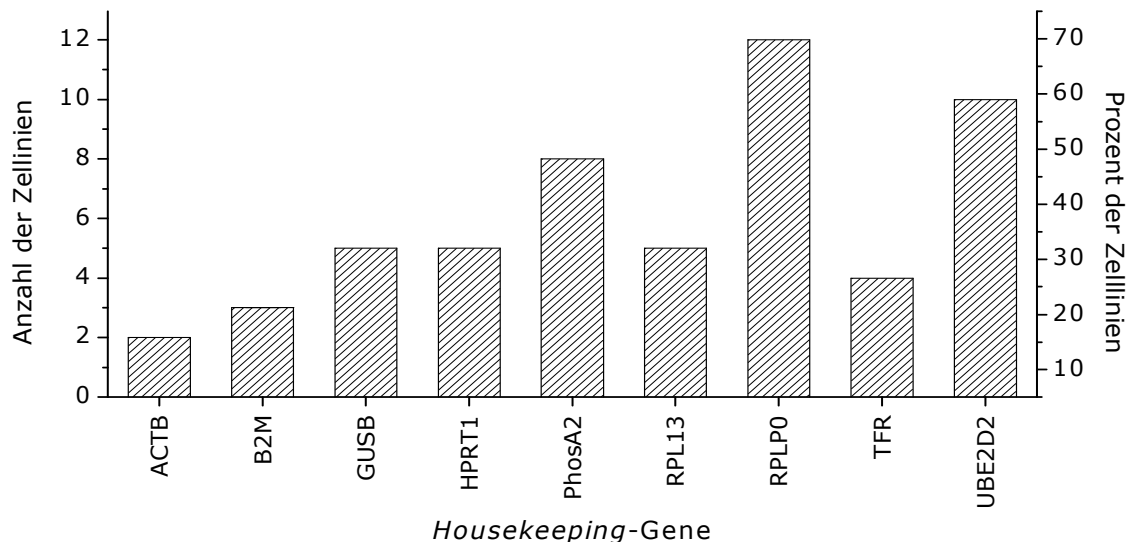


Abbildung 4.16: Übersicht über die Verteilung der Housekeeping-Gene; angegeben sind sowohl die absolute Anzahl der Zelllinien (von insgesamt 18, linke Ordinate), in der das entsprechende Gen als Housekeeping-Gen zu werten ist, als auch die prozentuale Verteilung (rechte Ordinate).

Berechnung der Expressionen der GOI nach geNorm

Mit Hilfe der ermittelten HKGs für jedes Zellpaar war eine Auswertung der Expression der GOIs möglich. Nachdem pro Probe der C_T -Wert des GOI über den Normalisierungsfaktor NF mit den HKGs in Verhältnis gesetzt worden war, konnte das Verhältnis der Cisplatin-behandelten zur unbehandelten Probe einer Zelllinie ermittelt werden (siehe Kapitel 3.11.3). Die Abbildungen 4.17 A–I zeigen jeweils das Expressionsverhältnis eines Gens in Cisplatin-behandelten gegenüber unbehandelten Zellen. Die Reskalierung (siehe Kapitel 3.11.3) wurde so durchgeführt, dass das GOI der unbehandelten Probe immer den Expressionsfaktor $1 \pm SD$ ergibt. So zeigen die Abbildungen die Reaktion der Zelllinien auf die Behandlung mit Cisplatin, ein Verhältnis > 1 bedeutet eine verstärkte Expression des Gens in der mit Cisplatin (1-2fache EC_{50}) behandelten Zelllinie.

AKR1B1, eines der Kandidatengene der SSH, wird in der Hälfte der Zelllinien auf Cisplatin-Behandlung hin verstärkt exprimiert (siehe Abbildung 4.17 A). Bei den resistenten Zelllinien MCF7, K562, HT29 und Caco2 sowie dem Zellpaar Cal27/Cal27res wird AKR1B1 auf Cisplatin-Behandlung signifikant hochreguliert, ebenso in den Zelllinien U937 und 2102. Am stärksten reagiert MCF7 mit einer 41fachen Überexpression von AKR1B1 auf Cisplatin. Auffallend ist, dass einzig beide A2780-Zelllinien AKR1B1 auf Cisplatin-Behandlung signifikant herabregulieren.

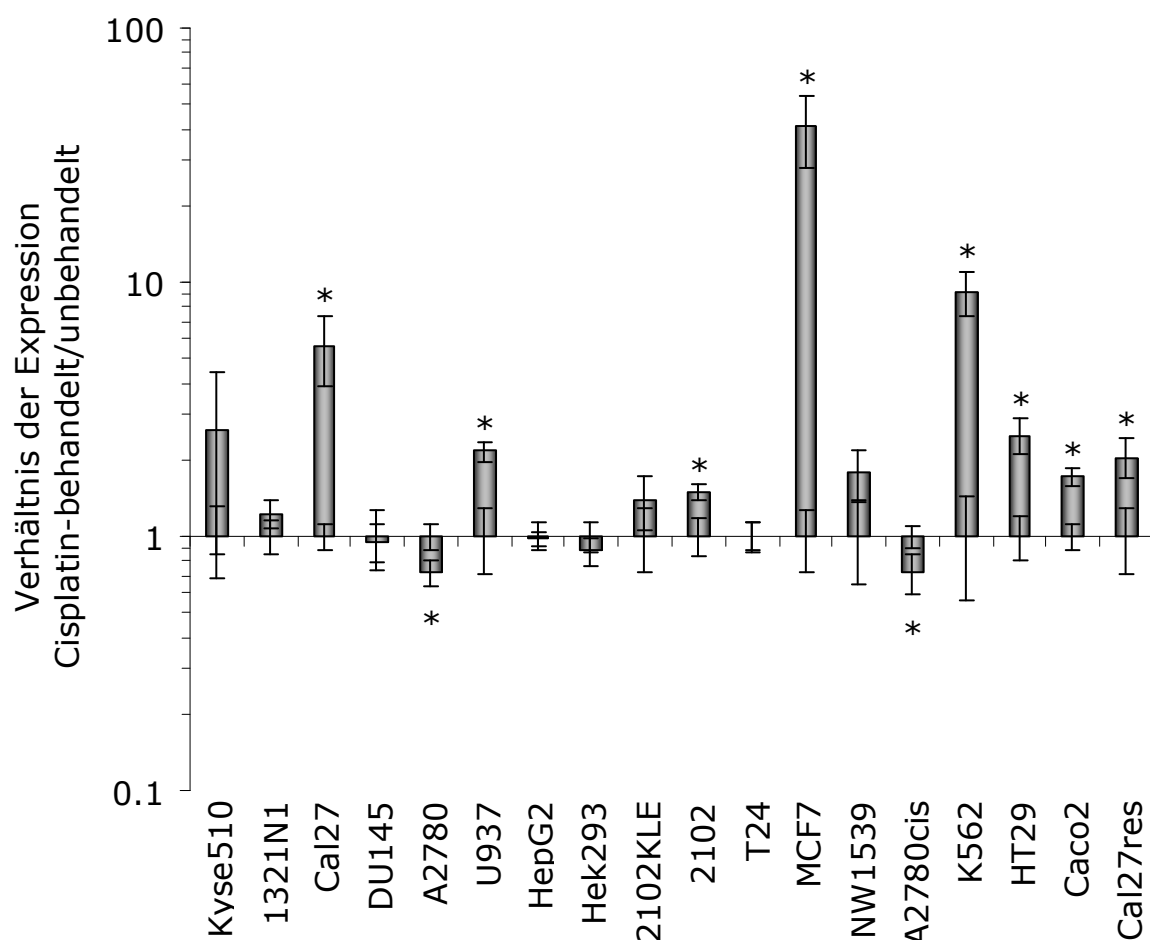


Abbildung 4.17 A: Verhältnis der Expression von AKR1B1 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$).

In dieser Expressionsstudie wurde ein weiteres Mitglied der Aldo-Keto-Reduktasen, **AKR1C1/2**, untersucht, das bereits im Zusammenhang mit Cisplatin-Resistenz beschrieben wurde.^{110;111} Eine detaillierte Erläuterung dieses Gens ist in Kapitel 5.2.1 zu finden. AKR1C1/2 zeigt, anders als AKR1B1, eine unterschiedliche Regulierung in dem Zellpaar A2780/A2780cis (siehe Abbildung 4.17 B): Die sensitive A2780 erhöht die Expression von AKR1C1/2 signifikant um den Faktor 2, die resistente A2780cis reguliert es um den Faktor 1,5 (nicht signifikant) herab. Die beiden Cal27-Zelllinien regulieren AKR1C1/2 um den Faktor 2 bis 3 herunter.

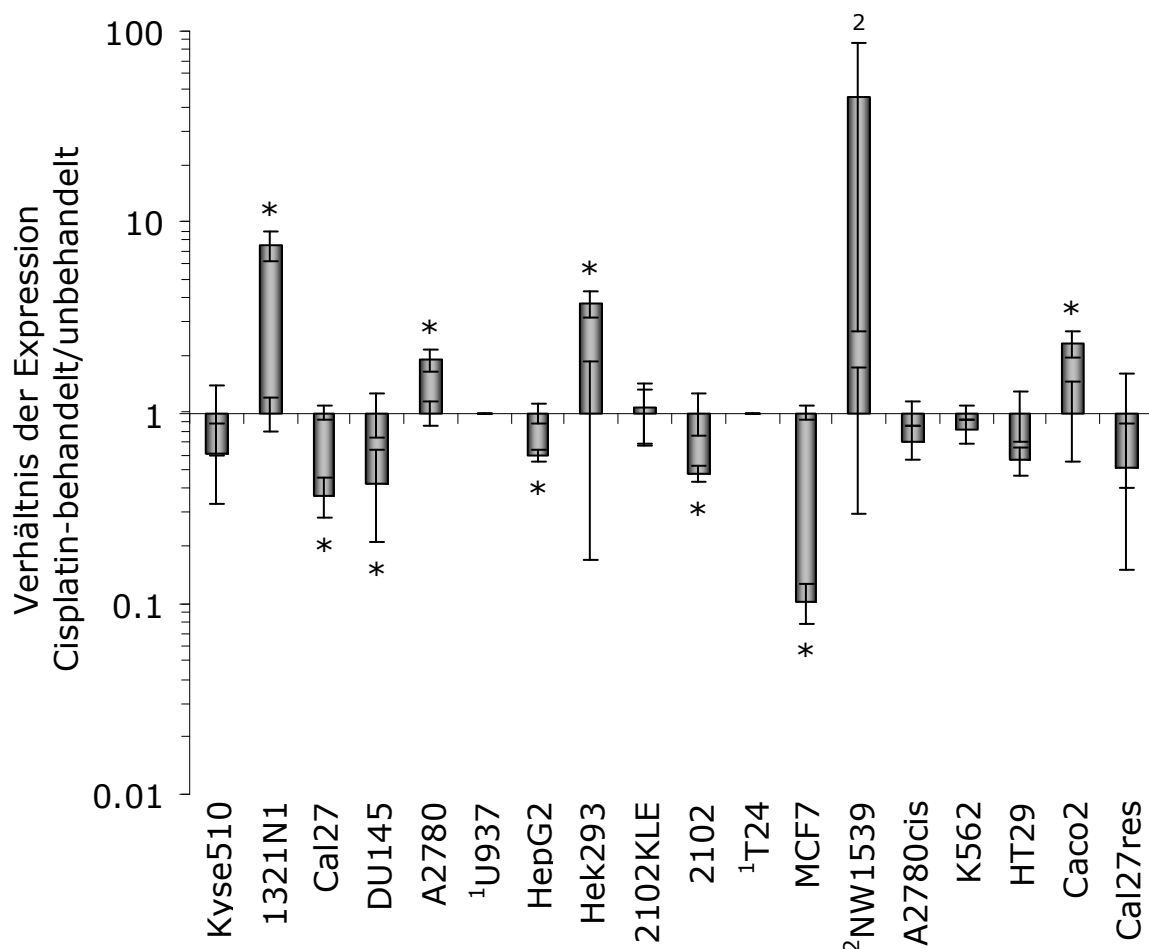


Abbildung 4-17 B: Verhältnis der Expression von AKR1C1/2 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$). ¹ Keine Genexpression detektierbar ($C_T > 40,0$). ² Aufgrund der sehr hohen C_T -Werte nur als Hinweis für eine Hochregulierung zu werten, Näheres im Text.

Die anderen Zelllinien reagieren sehr unterschiedlich in ihrer AKR1C1/2-Expression. Die sensitive Zelllinie 1321N1 reguliert AKR1C1/2 etwa 7,5fach hoch, Hek293 um den Faktor 3,7 und Caco2 um den Faktor 2,3 hoch.

Bei NW1539 war in der unbehandelten Probe keine Expression von AKR1C1/2 zu detektieren ($C_T > 40,0$). Der relativ große, nicht signifikante Expressionsfaktor von 44 ergibt sich rein rechnerisch wenn die unbehandelte Probe mit einem C_T -Wert von 40 gleichgesetzt wird. Der C_T -Wert der behandelten Probe liegt bei 35,2, also auch deutlich über 30 Zyklen. Dies ist als Hinweis für eine Anschaltung der Genexpression von AKR1C1/2 bei Cisplatin-Behandlung zu werten, aber sie ist nicht exakt zu quantifizieren. Des Weiteren gibt es aber auch Zelllinien, die die Expression von AKR1C1/2 bei Cisplatin-Behandlung signifikant herunterregulieren. Neben den bereits erwähnten beiden Cal27-Zelllinien und A2780cis ist dies vor allem MCF7, die AKR1C1/2 9,2fach herunterreguliert. Ebenfalls signifikant, aber in deutlich geringerem Ausmaß regulieren HepG2 (Faktor 1,7), 2102 (Faktor 2,1) und HT29 (Faktor 1,8) AKR1C1/2 signifikant herunter.

Von allen untersuchten Genen zeigt **CSTA**, ein weiteres Kandidatengen der SSH, im Durchschnitt die größte differentielle Regulierung zwischen Cisplatin-behandelten und -unbehandelten Zellen (siehe Abbildung 4.17 C). In zwei Drittel der Zelllinien ist CSTA auf Cisplatinbehandlung signifikant hochreguliert, jedoch nur in HT29-Zellen um den geringen Faktor 2,4 herunterreguliert. Keine signifikante Reaktion zeigen das Zellpaar Cal27 sowie Caco2. Die beiden A2780-Zelllinien reagieren mit einer Überexpression um den Faktor 4,2 bzw. 4,8 sehr ähnlich. Für die 116fache Überexpression von CSTA in DU145 gilt Ähnliches wie für die Expression von AKR1C1/2 in NW1539 ($C_T > 40,0$). Für die unbehandelte Probe von DU145 war keine Expression von CSTA nachzuweisen, die C_T -Werte der mit Cisplatin behandelten Probe lagen bei 32,2 Zyklen. Daraus ergibt sich in der mit Cisplatin behandelten Zelllinie DU145 rechnerisch eine 116fache Überexpression von CSTA mit signifikantem Unterschied, die aber aufgrund der hohen C_T -Werte nur als Hinweis auf eine Überexpression nach Cisplatin-Behandlung anzusehen ist.

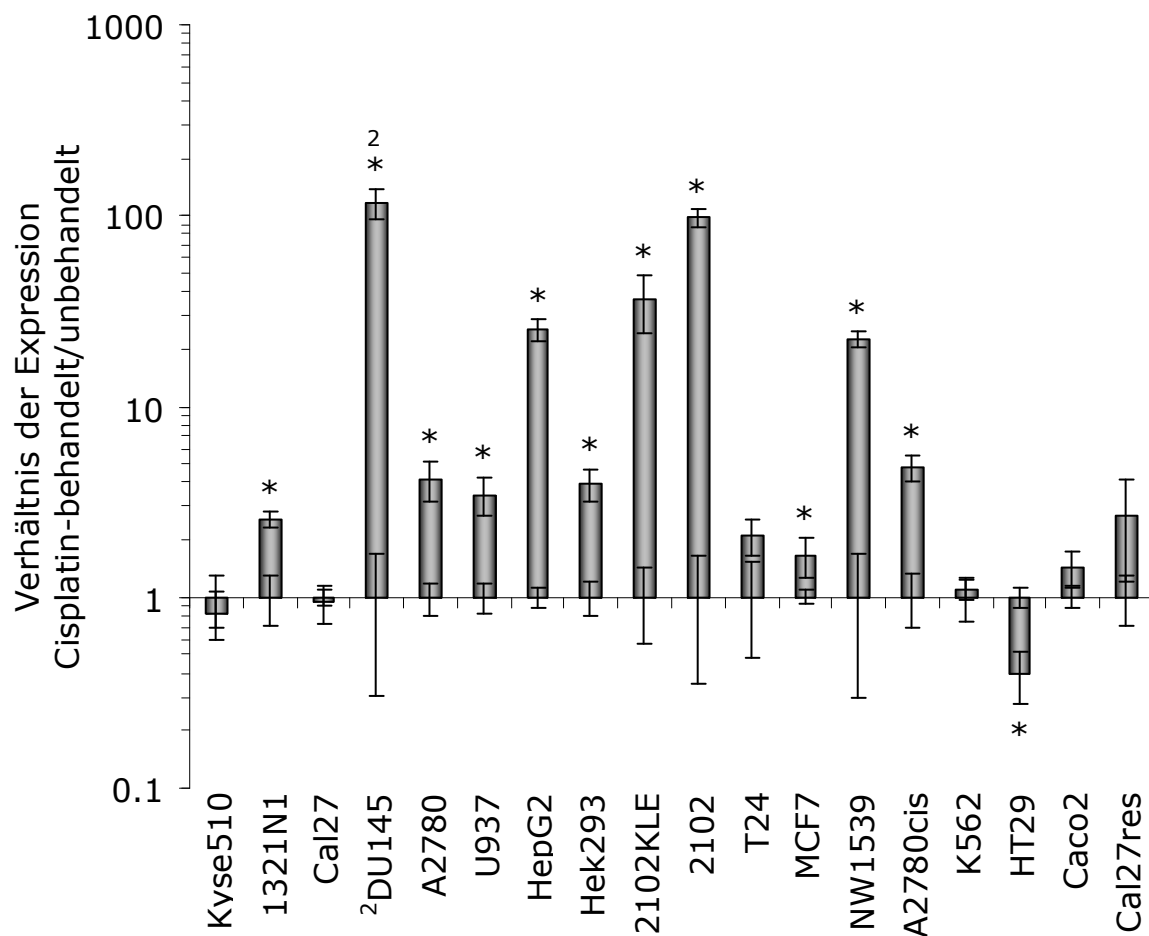


Abbildung 4.17 C: Verhältnis der Expression von CSTA in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$). ² Aufgrund der sehr hohen C_T -Werte nur als Hinweis für eine Hochregulierung zu werten, Näheres im Text.

Bei einem der Gegenspieler von CSTA, **CTSB**, das als weiteres Gen in diese Genexpressionsstudie aufgenommen worden ist (weitere Informationen zu CTSB in Kapitel 5.2.2), zeigt sich ebenfalls ein sehr heterogenes Bild bezüglich der Expression von CTSB als Reaktion auf Cisplatin-Behandlung (siehe Abbildung 4.17 D). Am deutlichsten reagiert Cal27 mit einer 7fachen Herunterregulierung von CTSB auf Cisplatin, wohingegen Cal27res keine Veränderung zeigt. Ansonsten reagieren die Zelllinien 1321N1, DU145 und T24 mit einer signifikanten Herabregulation von CTSB und HepG2, die beiden 2102-Zelllinien, K562 und Caco2 regulieren CTSB signifikant hoch. Die Hälfte der Zelllinien reagiert nicht.

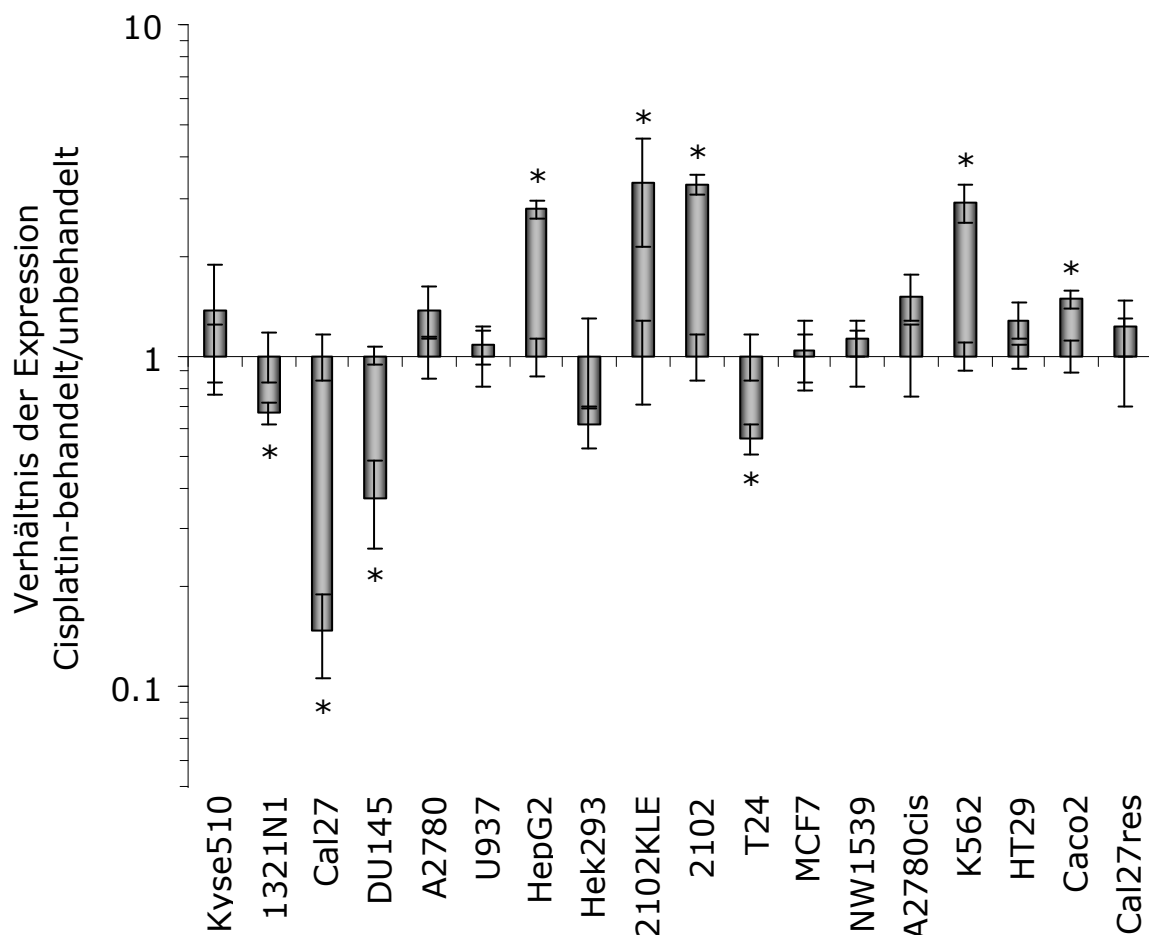


Abbildung 4.17 D: Verhältnis der Expression von CTSB in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$).

DKK1, eines der Kandidatengene der SSH, wird in beiden Cal27-Zelllinien durch Cisplatin-Behandlung signifikant hochreguliert - um den Faktor 11,2 in den sensitiven Cal27, und in den resistenten Cal27res um den Faktor 2,1 (siehe Abbildung 4.17 E). Mit einer signifikanten Zunahme der DKK1-Expression auf Cisplatin-Stress reagieren auch Hek293 (Faktor 1,7), MCF7 (Faktor 2,9), HT29 (Faktor 5,6).

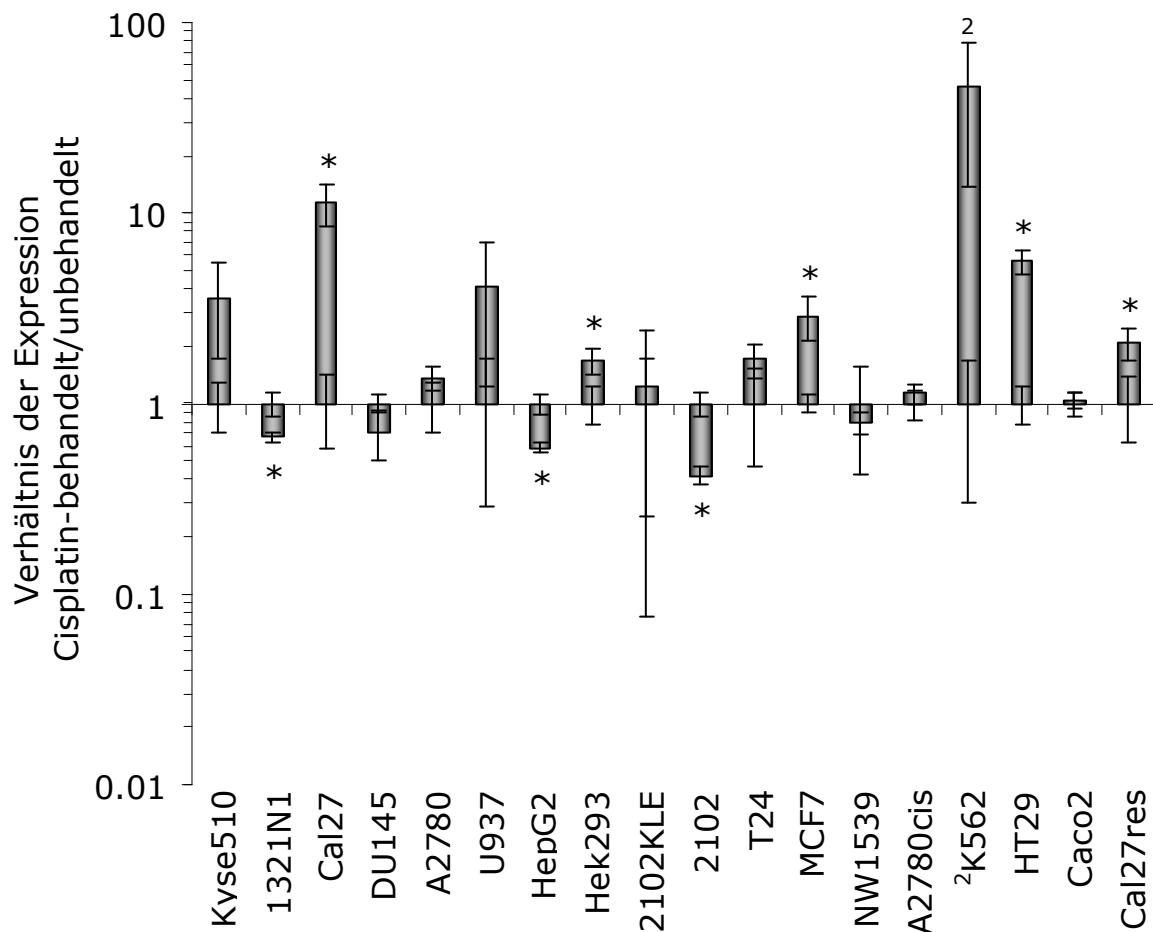


Abbildung 4.17 E: Verhältnis der Expression von DKK1 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$). ² Aufgrund der sehr hohen C_T -Werte nur als Hinweis für eine Hochregulierung zu werten, Näheres im Text.

Insgesamt sind auch bei DKK1, ähnlich wie bei CTSB, die Faktoren der differentiellen Genexpression eher gering. Die 46fache Hochregulierung von DKK1 in K562 ist hier, wie schon die Hochregulierung von CSTA in DU145 und AKR1C1/2 in NW1539, lediglich als ein Hinweis zu sehen. Wiederum war in der unbehandelten Probe von K562 keine Expression von DKK1 zu detektieren ($C_T > 40,0$), und eines der beiden Duplikate der behandelten Probe zeigte einen C_T -Wert von 35,7, das zweite Duplikat zeigte kein Signal ($C_T > 40,0$).

EGR1, ein Gen, das aufgrund seiner Funktion als Stress-induziertes *immediate-early*-Gen und direkter Regulator verschiedener Tumorsuppressorgene¹¹² in diese Genexpressionsstudie aufgenommen wurde, zeigt deutlich größere differentielle Genexpressionen auf Cisplatin-Stress als die Gene DKK1 und CTSB (siehe Abbildung 4.17 F).

Die Expression von EGR1 wird durch Cisplatin mit Ausnahme von drei Zelllinien induziert. Die Faktoren, um die EGR1 hoch reguliert wird, sind besonders in 1321N1 (Faktor 32) und A2780 (Faktor 136) sehr hoch. EGR1 wird auch in den mit Cisplatin behandelten U937 hoch reguliert. Da in der unbehandelten Probe aber keine Expression detektierbar war ($C_T > 40$) und die behandelte Probe C_T -Werte von 31,9 Zyklen zeigt, ist dies nur als ein Hinweis zu sehen. Deutlich abweichend von den anderen Zelllinien reagieren Kyse510 und NW1539 auf die Cisplatin-Behandlung: Die beiden Zelllinien regulieren EGR1 signifikant herunter (Kyse510: 7fach, NW1539: 9fach).

Die beiden Cal27-Zelllinien reagieren ähnlich, nämlich mit einer leichten Induktion von EGR1 (Cal27 nicht signifikant, Cal27res Faktor 2,6 signifikant) auf die Cisplatin-Behandlung. Bei dem Zellpaar A2780/A2780cis reagiert die sensitive Zelllinie deutlich stärker (Induktion um den Faktor 136) als die resistente A2780cis (Induktion um den Faktor 2,3) auf die Cisplatin-Behandlung.

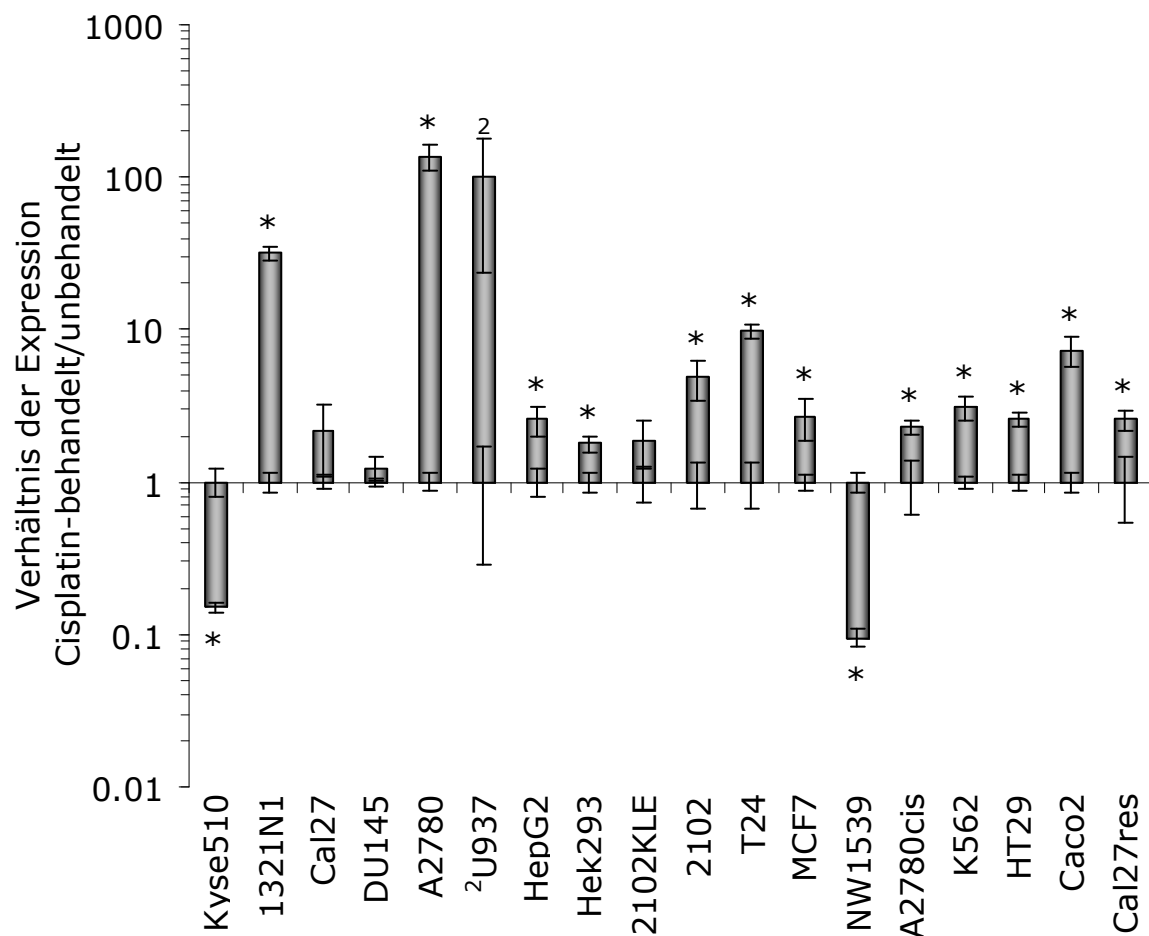


Abbildung 4.17 F: Verhältnis der Expression von EGR1 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm$ SD). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$). ² Aufgrund der sehr hohen C_T -Werte nur als Hinweis für eine Hochregulierung zu werten, Näheres im Text.

p53 wurde als weiteres Tumorsuppressorgen¹¹³ und Regulator der DKK1-Expression¹¹⁴ in diese Genexpressionsstudie aufgenommen. Nähere Details zur Funktion von p53 sind im Kapitel 5.2.3 zu finden. Abbildung 4.17 G zeigt, dass p53 in allen Zelllinien außer Kyse510, 2102KLE und HT29 durch Cisplatin signifikant induziert wird, allerdings liegen die Faktoren lediglich zwischen 2 und 5.

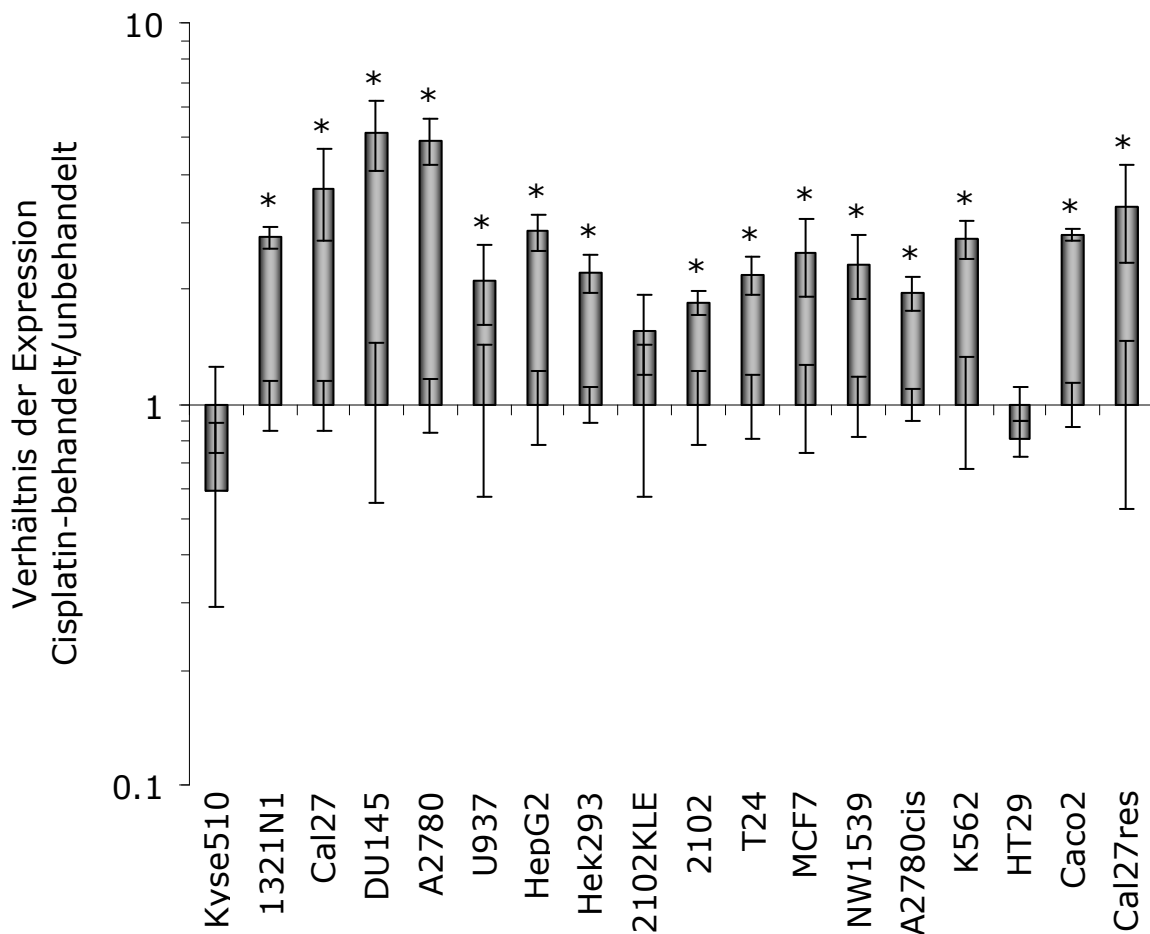


Abbildung 4.17 G: Verhältnis der Expression von p53 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$).

RPL5, ein Kandidatengens der SSH, wird nur in drei der 18 untersuchten Zelllinien signifikant reguliert (HT29: 3,6fach herunter, 1321N1: 2,3fach hoch und DU145: 1,8fach hoch). Dies ist von allen untersuchten Genen die geringste Expressionsänderung auf Cisplatin-Behandlung (siehe Abbildung 4.17 H).

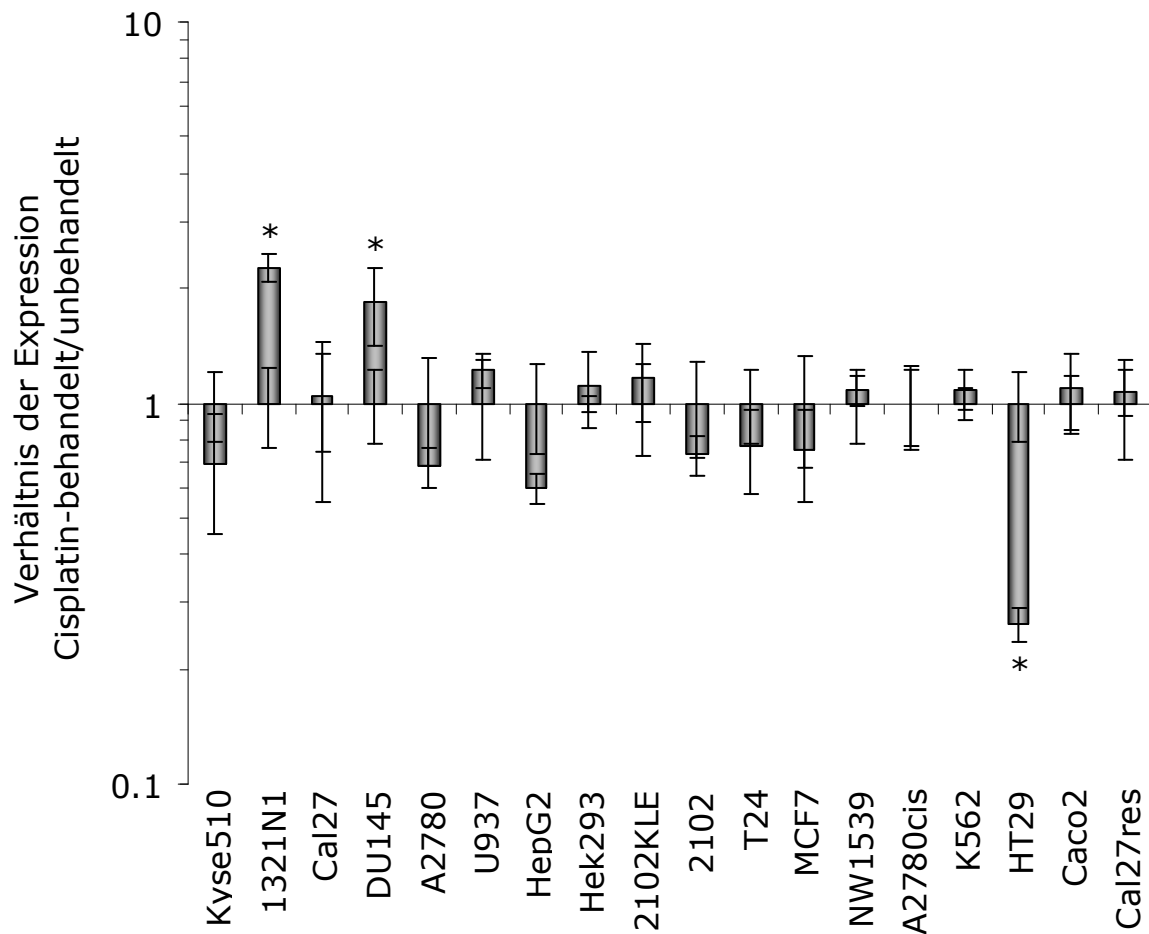


Abbildung 4.17 H: Verhältnis der Expression von RPL5 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$).

Cisplatin induziert **THBS1**, das fünfte Kandidatengen der SSH, in einem Großteil der Zelllinien (siehe Abbildung 4.17 I). In den fünf Zelllinien Kyse510, Cal27, A2780, A2780cis und K562 zeigt sich eine signifikante Überexpression um Faktoren zwischen 10 und 80. Signifikant gegensätzlich reagiert Caco2 mit einer Herabregulierung um den Faktor 3,5. In U937 ist THBS1 nicht detektierbar ($C_T > 40,0$).

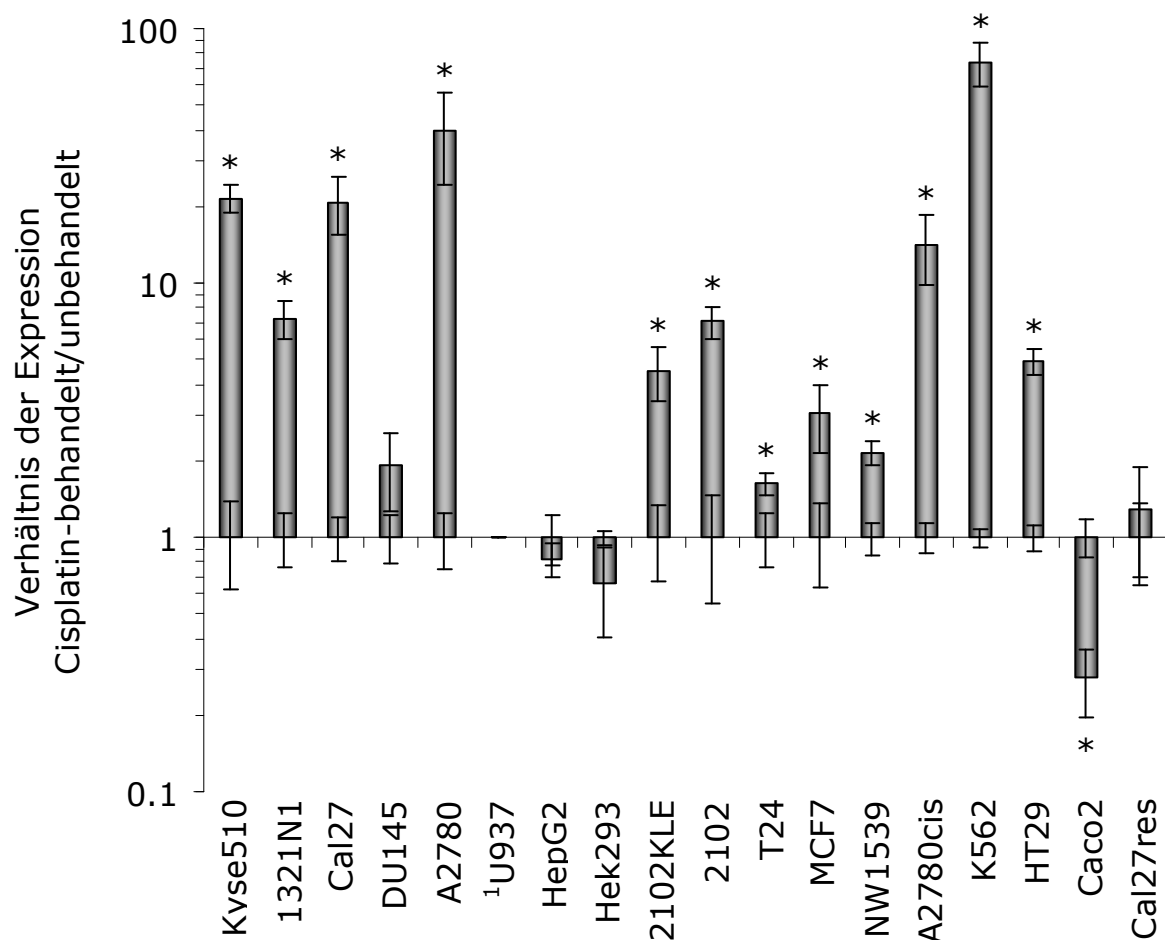


Abbildung 4-17 I: Verhältnis der Expression von THBS1 in den mit Cisplatin behandelten Zelllinien und den jeweils unbehandelten Kontrollen (Expression = $1,0 \pm SD$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) der relativen Expression, ermittelt nach geNorm, bei behandelten bzw. unbehandelten Zellen aus den PCR-Duplikaten bezogen auf 3 HKGs. * Signifikanter Unterschied zwischen behandelt und unbehandelt ($p < 0,05$). ¹ Keine Genexpression detektierbar ($C_T > 40,0$).

Bei dem Zelllinienpaar Cal27/Cal27res fällt auf, dass die sensitive Zelllinie Cal27 auf die Cisplatin-Behandlung mit einer deutlich stärkeren Induktion von THBS1 (Faktor 21, signifikant) reagiert als die resistente Cal27res (nicht signifikant). Die gleiche Tendenz zeigt das Zelllinienpaar A2780/A2780cis, jedoch mit noch größeren Faktoren. A2780 induziert THBS1 um den Faktor 40 und A2780cis um den Faktor 14 auf die Cisplatin-Behandlung.

III Berechnung der Expression in den Zelllinien nach NormIt

Mit Hilfe der qRT-PCR-Auswertungsmethode nach geNorm lassen sich gut ähnliche cDNA-Proben im Hinblick auf ihre Genexpression miteinander vergleichen. Es ist möglich, jeweils die mit Cisplatin behandelte Probe mit ihrer unbehandelten Kontrolle nach der Standardisierung über drei nach geNorm ermittelte HKGs zu vergleichen. Da beide Proben aus einer Zelllinie gewonnen wurden, sollte per Definition die Expression der HKGs allein durch die Behandlung mit Cisplatin nicht beeinflusst werden. Bei dem Vergleich der Genexpression von 18 verschiedenen Zelllinien ist es schwer möglich, alle Zelllinien auf drei HKGs zu standardisieren. Diese 18 Zelllinien gehen zurück auf 14 verschiedene Gewebearten. Verschiedene Organe und Gewebe unterscheiden sich extrem in ihrem Genexpressionsmuster, so auch in der Genexpression von jedem potentiellen HKGs. Die Standardisierung auf nur drei HKGs wäre für einen Teil der Zelllinien mit einem großen Fehler behaftet, da geNorm über alle Proben nach den stabilsten HKG schaut und jeweils pro Analyseschritt ein Gen über alle Proben eliminiert. Je größer und komplexer die Datenmatrix wird, desto weniger geeignet scheint daher geNorm.

Wenn ein Gen in einem Gewebe sehr deutlich in seiner Expression von der Expression in den anderen Geweben abweicht, führt es bei geNorm dazu, dass dieses Gen nicht als HKG in Frage kommt. Aufgrund dieser Tatsache wurde die Auswertemethode **NormIt** entwickelt, mit der dann nur das Gen in der einen Probe (nicht wie bei geNorm über alle Proben) als HKG eliminiert wird. Dazu wird versucht, partielle Überlappungen gleicher Verhältnisse der potentiellen HKGs über alle Proben zu erkennen. Aus diesen setzt sich das allgemeine Expressionsprofil der HKGs zusammen. Für jede Probe werden diejenigen potentiellen HKGs eliminiert, die diesem Expressionsprofil nicht entsprechen. Dadurch kann die Anzahl der letztendlich für die Normalisierung verwendeten HKGs von Probe zu Probe variieren.

Das iterative Verfahren NormIt wurde aufgrund fehlender Programmierkenntnisse Schritt für Schritt nicht automatisiert durchgeführt, so dass

auch eine Validierung anhand eines Testdatensatzes und damit der Beweis der Stärken und Schwächen von geNorm gegen NormIt noch ausbleiben. Für die Standardisierung weniger, gleichartiger Proben steht geNorm zur Verfügung. Für die Standardisierung einer Vielzahl von Proben unterschiedlichster Gewebe scheint die Grundidee der Auswertung nach NormIt besser geeignet als die Reduktion auf drei HKGs über viele, verschiedenartige Proben bei geNorm. Um nicht Gefahr zu laufen, sowohl mit geNorm als auch mit NormIt falsche HKGs auszuwählen bzw. richtige im Laufe der Iteration zu eliminieren, müsste eine Kontrollfunktion in eine Automatisierung von NormIt aufgenommen werden. Diese könnte in Form einer *Leave-one-out*-Kreuzvalidierung erfolgen. Eine andere Möglichkeit zur Normalisierung von PCR-Daten wäre die Normierung einer Probe auf die durchschnittliche Expression aller Gene. Dieses Verfahren wird in der Auswertung von Mikroarrays angewendet, setzt jedoch auch eine große Datenmatrix voraus.

NormIt bietet gegenüber geNorm die Möglichkeit, die korrigierten C_T -Werte verschiedener Zelllinien direkt miteinander zu vergleichen. Theoretisch wäre ein Vergleich aller 18 Zelllinien untereinander mit geNorm auch möglich, jedoch würde dies die Verwendung von gleichen HKGs über alle Zelllinien voraussetzen. Im Folgenden werden die gleichen PCR-Daten, die bereits nach geNorm für jedes Zellpaar (Cisplatin-behandelt und -unbehandelt) ausgewertet worden sind, mit NormIt ausgewertet. Die Abbildungen 4.18 A-I zeigen jeweils diese normierte Expression eines Genes im Vergleich aller Zelllinien.

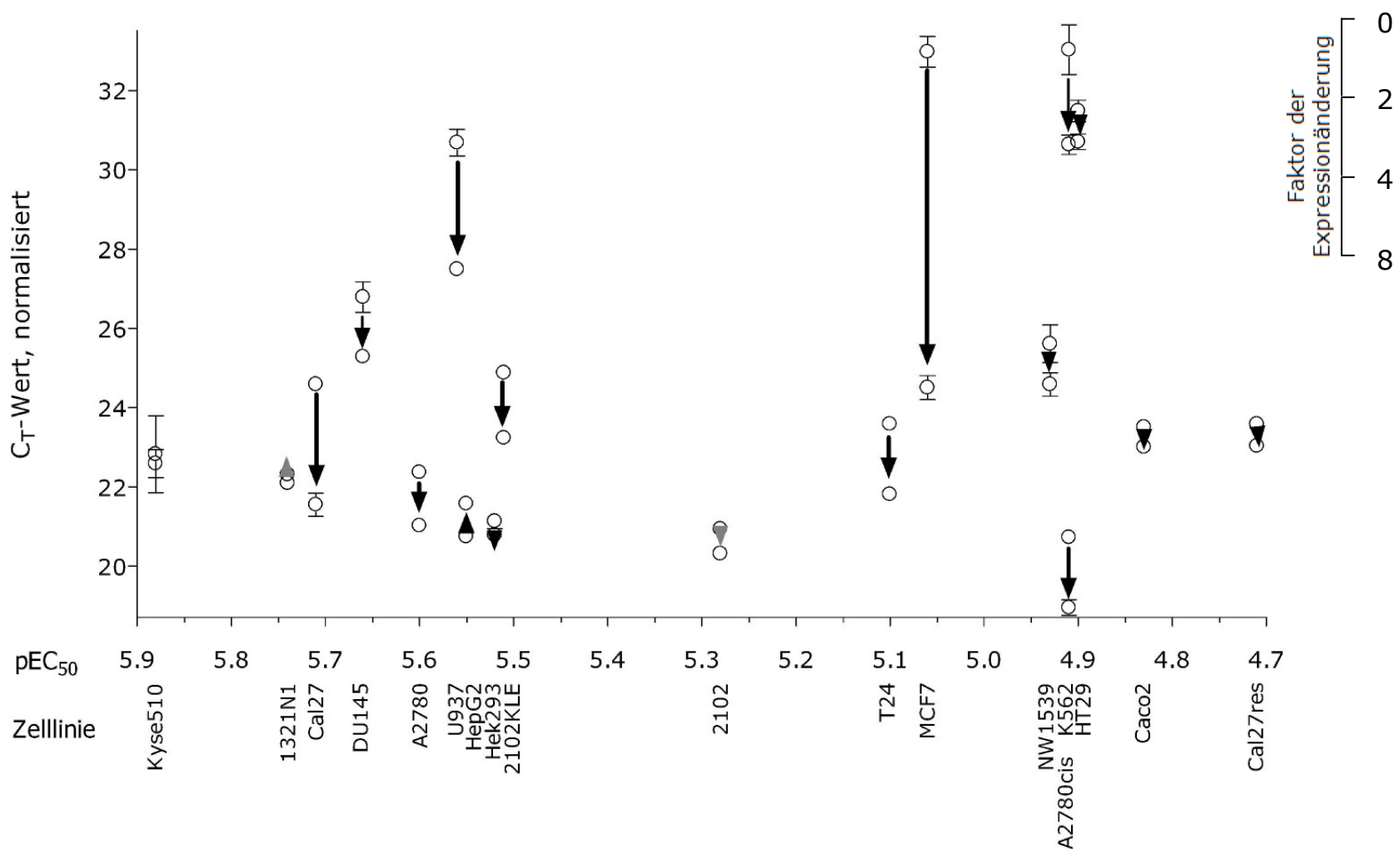
AKR1B1

Abbildung 4.18 A: Mittels NormIt normierte C_T -Werte von AKR1B1 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T -Wert der behandelten Probe. \rightarrow = nicht signifikant, \rightarrow = $p < 0,05$, \rightarrow = $p < 0,01$ und \rightarrow = $p < 0,001$.

Bei **AKR1B1** (siehe Abbildung 4.18 A) fällt auf, dass mit Ausnahme von vier Zelllinien (Kyse510, 1321N1, HepG2 und 2102) die übrigen Zelllinien AKR1B1 auf Cisplatin-Behandlung signifikant hochregulieren. Vier weitere Zelllinien fallen auf, die basal sehr niedrige AKR1B1-Spiegel haben: U937, MCF7, K562 und HT29. Bis auf HT29 reagieren diese Zelllinien mit recht großen Faktoren, sie regulieren AKR1B1 6,1fach hoch (U937), 89fach hoch (MCF7) und 5,3fach hoch (K562), jeweils ausgehend von C_T -Werten größer 30 Zyklen. HT29 reguliert AKR1B1 nur 1,7fach hoch, ausgehend von 31,5 Zyklen auf 30,7 Zyklen. So große differentielle Expressionen von AKR1B1 wie die drei zuvor genannten Zelllinien zeigt sonst nur Cal27. Cal27 reguliert AKR1B1 8fach hoch, ausgehend von mittleren Basal-Spiegeln von 24,6 Zyklen auf 21,6 Zyklen. Die höchsten AKR1B1-Spiegel zeigt die Zelllinie A2780cis, deren basaler C_T -Wert bereits bei 20,7 Zyklen liegt und die AKR1B1 3,4fach hochreguliert.

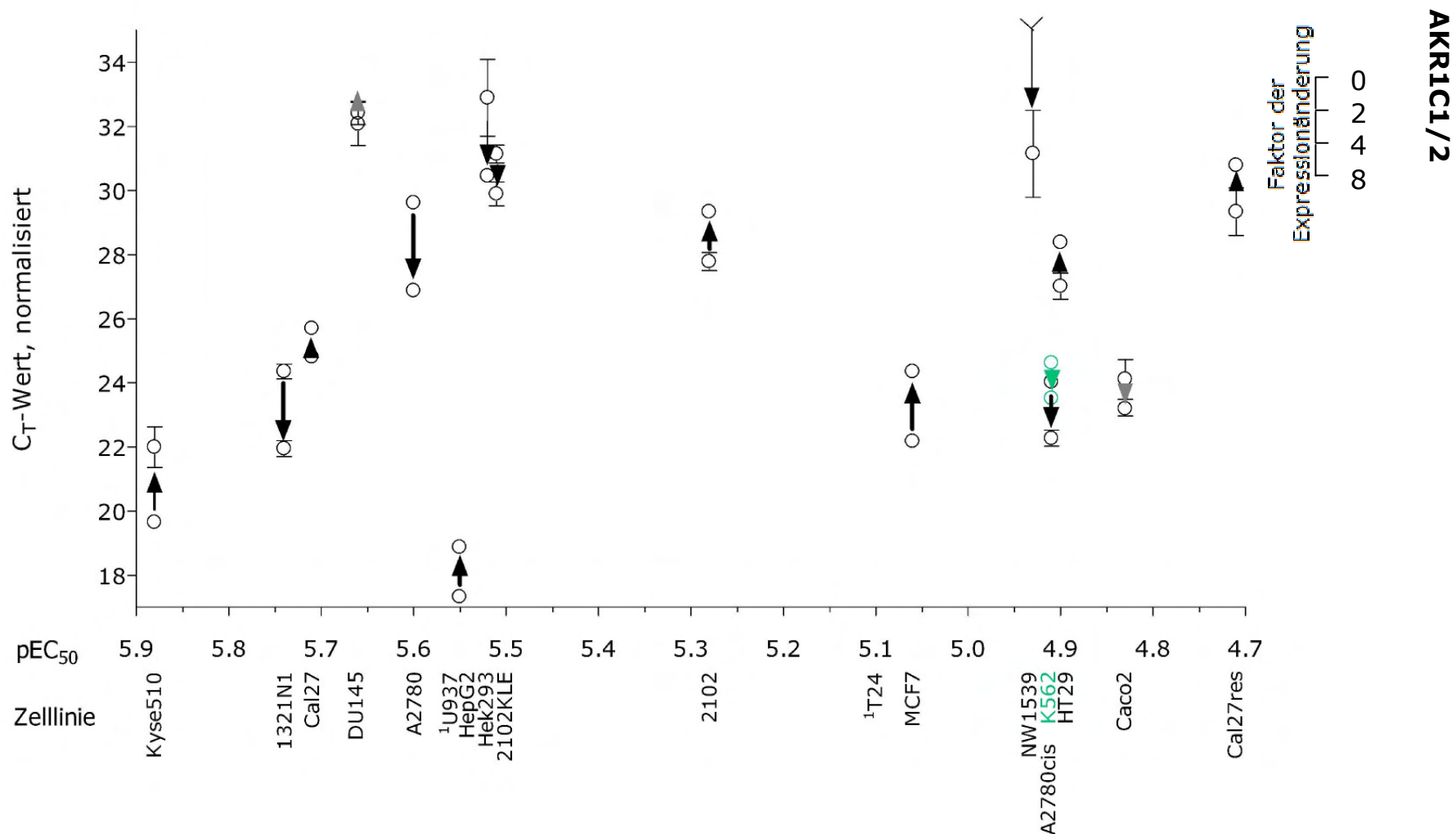


Abbildung 4.18 B: Mittels NormIt normierte C_T-Werte von AKR1C1/2 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T-Wert der behandelten Probe. ➡ = nicht signifikant, ➤ = p < 0,05, ➤➤ = p < 0,01 und ➤➤➤ = p < 0,001. ¹ keine Genexpression detektierbar (C_T > 40,0). Der Pfeil ➤➤➤ bei NW1539 bedeutet, dass der C_T-Wert der unbehandelten Probe nicht detektierbar war (C_T > 40,0).

Die zweite untersuchte Aldoketoreduktase **AKR1C1/2** (siehe Abbildung 4.18 B) zeigt in der Genexpression keine Parallelen zu AKR1B1. Einzig die Zelllinie U937, die geringe AKR1B1-Spiegel aufwies, zeigt keine nachweisbare Expression von AKR1C1/2 sowohl in der unbehandelten als auch in der behandelten Probe von U937 ($C_T > 40,0$). Betrachtet man die sensitiven Zelllinien Kyse510, 1321N1, Cal27, A2780, Hek293 und 2102KLE (unter Nichtberücksichtigung von DU145, HepG2 und U937), kann man die Basal-Expression von AKR1C1/2 mit der Cisplatin-Resistenz (pEC_{50}) korrelieren: Mit abnehmender Expression von AKR1C1/2 nimmt die Resistenz zu.

Vergleicht man die beiden Cal27-Zelllinien, zeigt ebenfalls die resistente Cal27res basal eine niedrigere Expression von AKR1C1/2 (C_T -Wert von 29,3) als die sensitive Zelllinie Cal27 (C_T -Wert von 24,8). Beim Zelllinienpaar A2780 trifft dies jedoch nicht zu, die sensitive Zelllinie A2780 exprimiert basal weniger AKR1C1/2 (C_T -Wert von 29,6) als die resistente A2780cis (C_T -Wert von 24,0).

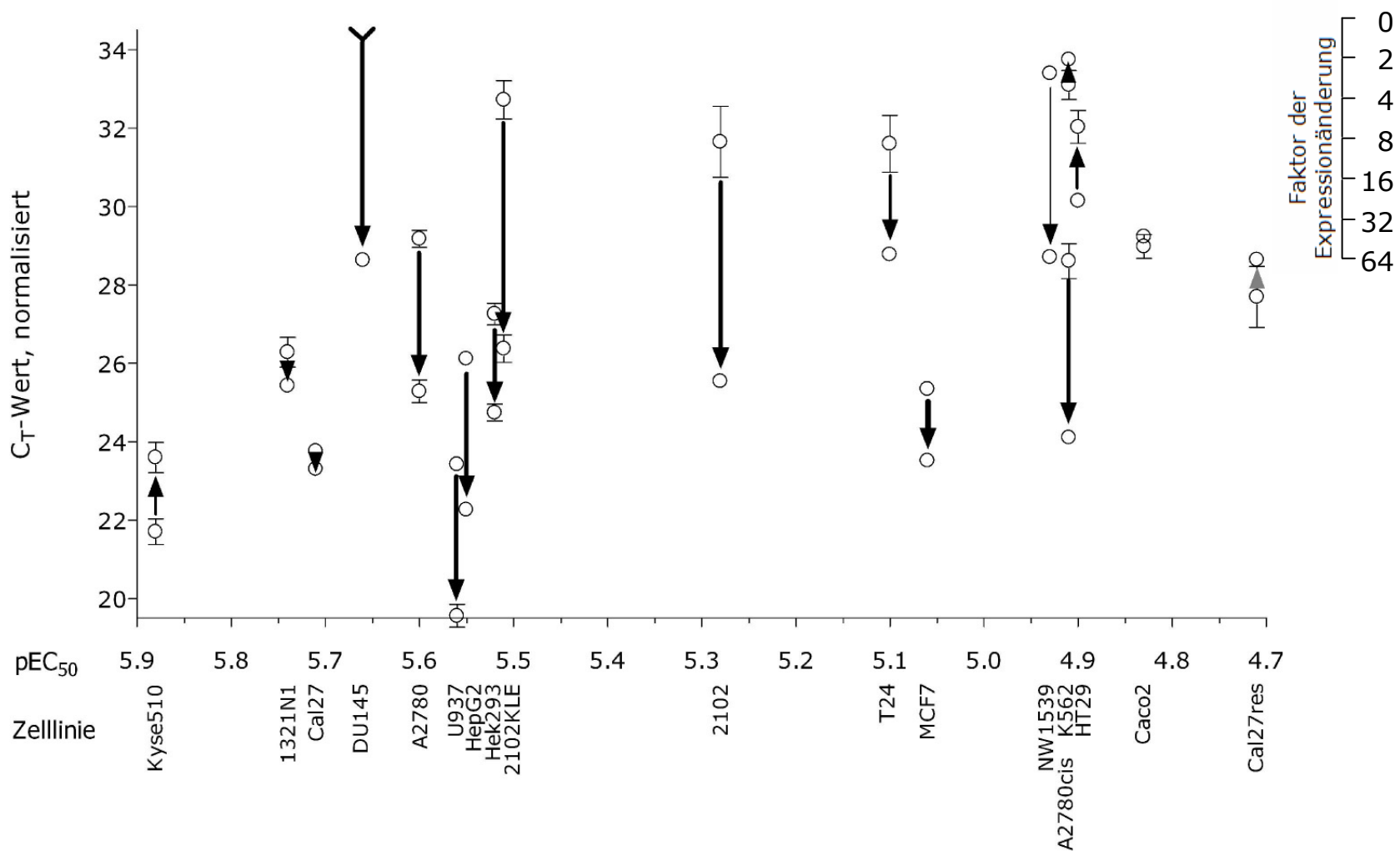
CSTA

Abbildung 4.18 C: Mittels NormIt normierte C_T-Werte von CSTA in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T-Wert der behandelten Probe. ➔ = nicht signifikant, ➤ = p < 0,05, ➥ = p < 0,01 und ➦ = p < 0,001. Der Pfeil ➤ bei DU145 bedeutet, dass der C_T-Wert der unbehandelten Probe nicht detektierbar war (C_T > 40).

CSTA wird von den meisten Zelllinien auf Cisplatin-Behandlung hochreguliert (siehe Abbildung 4.18 C). Eine Ausnahme sind die hochresistenten Zelllinien, von denen K562 und HT29 CSTA signifikant herunterregulieren, und Caco2 und Cal27res zeigen keine signifikante Änderung der CSTA-Expression auf Cisplatin-Behandlung. Alle anderen Zelllinien mit pEC_{50} -Werten zwischen 4,9 und 5,8 regulieren CSTA signifikant hoch. Die unbehandelte Probe der Zelllinie DU145 zeigt keine detektierbare CSTA-Expression ($C_T > 40,0$) im Gegensatz zur behandelten, die einen C_T -Wert von 28,6 hervorbringt. Ohne genau zu quantifizieren ist dies eine drastische Hochregulierung mit einem Faktor wesentlich größer als 100. Nicht ganz so stark, aber im Vergleich zu den anderen untersuchten Genen enorm, wird CSTA in den Zelllinien 2102 KLE (81,2fach) und 2102 (68,9fach) induziert. Von den sensitiven Zelllinien ist Kyse510 die einzige, die CSTA um den Faktor 3,7 signifikant herunterreguliert. Die beiden A2780-Zelllinien reagieren sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich nicht im Basal-Spiegel von CSTA (C_T -Wert 29,2 bei A2780 und C_T -Wert 28,6 bei A2780cis) und induzieren CSTA um den Faktor 14,8 (A2780) bzw. 22,6 (A2780cis).

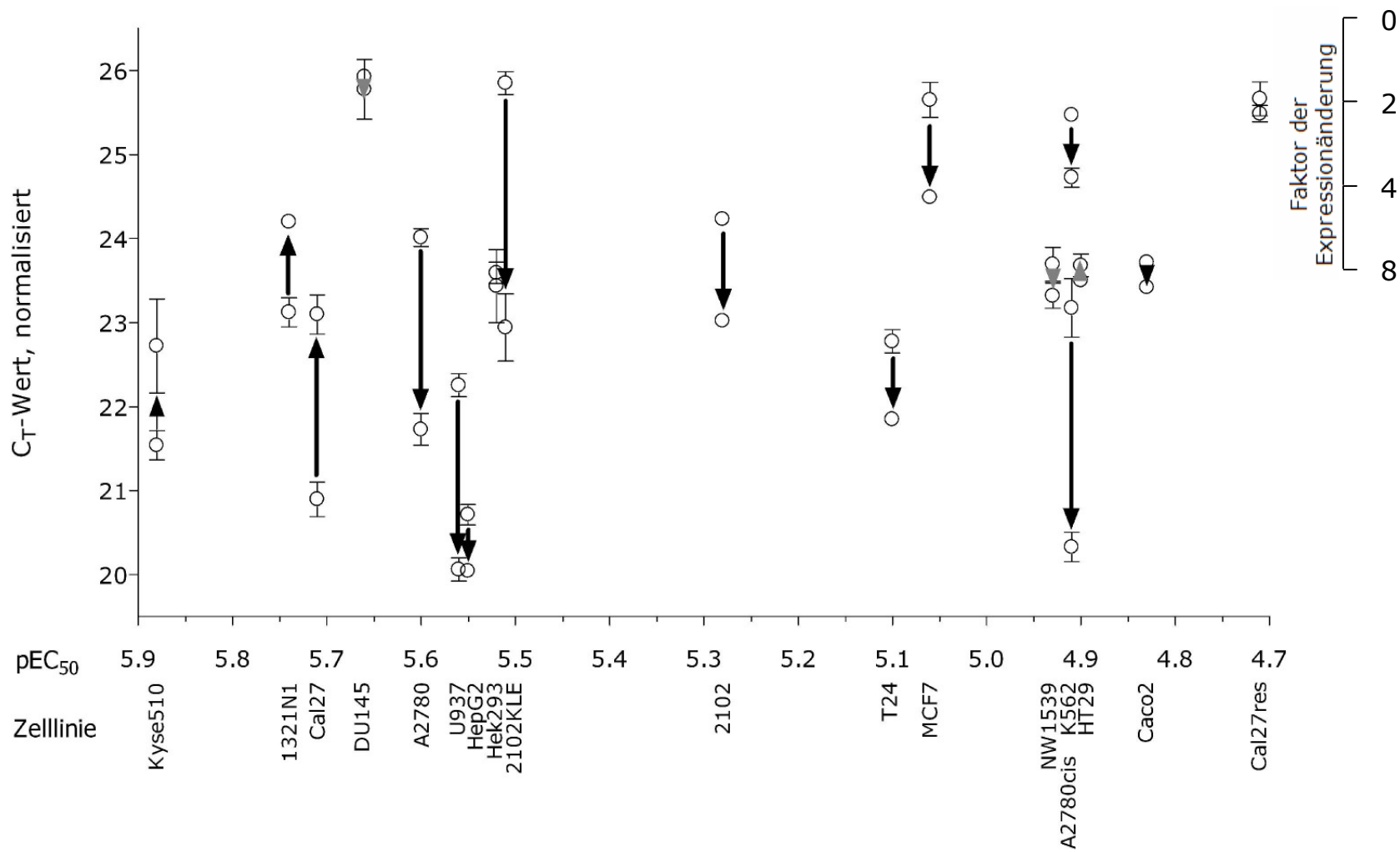
CTSB

Abbildung 4.18 D: Mittels NormIt normierte C_T -Werte von CTSB in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T -Wert der behandelten Probe. \rightarrow = nicht signifikant, \rightarrow = $p < 0,05$, \rightarrow = $p < 0,01$ und \rightarrow = $p < 0,001$.

Bei der Regulierung von **CTSB** (siehe Abbildung 4.18 D) fällt auf, dass die sensitiven Zelllinien in der Regel eine größere differentielle Genexpression zwischen der unbehandelten und der mit Cisplatin behandelten Probe zeigen als die resistenten Zelllinien. Jedoch ist keine generelle Richtung der Expressionsänderung auf die Cisplatin-Behandlung zu erkennen: Kyse510, 1321N1 und Cal27 regulieren CTSB 2,1- bis 4,6fach herunter, A2780, U937 und 2102KLE dagegen regulieren CTSB mit Faktoren zwischen 3 und 7,5 hoch. Bei den resistenten Zelllinien zeigt einzig A2780cis eine 7,2fache Überexpression in der mit Cisplatin behandelten Probe, die übrigen resistenten Zelllinien regulieren CTSB mit Faktoren bis maximal 2,2 hoch. Keine der resistenten Zelllinien zeigt eine Herabregulierung von CTSB. Unter allen Zelllinien zeigen fünf keine signifikante Änderung der CTSB-Spiegel als Reaktion auf Cisplatinbehandlung (DU145, Hek293, NW1539, HT29 und Cal27res). Bei den beiden Zellpaaren Cal27 und A2780 zeigen sich deutliche Unterschiede. Die sensitive Zelllinie Cal27 hat basal etwa 24fach höhere CTSB-Spiegel (C_T -Wert 20,9) als die resistente Cal27res (C_T -Wert 25,5) und reguliert CTSB 4,6fach herunter (auf C_T -Wert 23,1). Dagegen zeigt die resistente Zelllinie Cal27 keine Änderung der CTSB-Expression auf die Cisplatin-Behandlung. Im Gegensatz dazu verhalten sich die beiden A2780-Zelllinien etwa gleich. Von den beiden Zelllinien hat die resistente A2780cis basal etwas höhere CTSB-Spiegel (Faktor 1,7), beide zeigen jedoch eine Hochregulierung auf Cisplatin-Behandlung (Faktor 4,9 in der sensitiven A2780 und Faktor 7,2 in der resistenten A2780cis).

Der Unterschied der basalen CTSB-Expression aller Zelllinien ist gering. Am meisten CTSB-mRNA hat die Zelllinie HepG2 (C_T -Wert 20,7), am wenigsten DU145 (C_T -Wert 25,9). Das ist nur etwa 37fach weniger CTSB als in HepG2. Diese Spanne ist die niedrigste, die bei dieser Genexpressionsstudie aller untersuchten Gene beobachtet worden ist. Eine Korrelation der CTSB-Expression mit der Expression des CTSB-Antagonisten CSTA lag nicht vor. CSTA ist jedoch nicht der einzige Gegenspieler von CTSB (nähere Erläuterungen siehe Kapitel 5.2.2), so dass hier, um einen Überblick über das Zusammenspiel der Cystatine mit den Cathepsinen zu erhalten, die Untersuchung der anderen Cystatine und Cathepsine für weitere Erkenntnisse hilfreich wäre. In dieser Genexpressionsstudie wurde nur CTSB als Gegenspieler von CSTA, einem der Kandidatengene der SSH, mit untersucht.

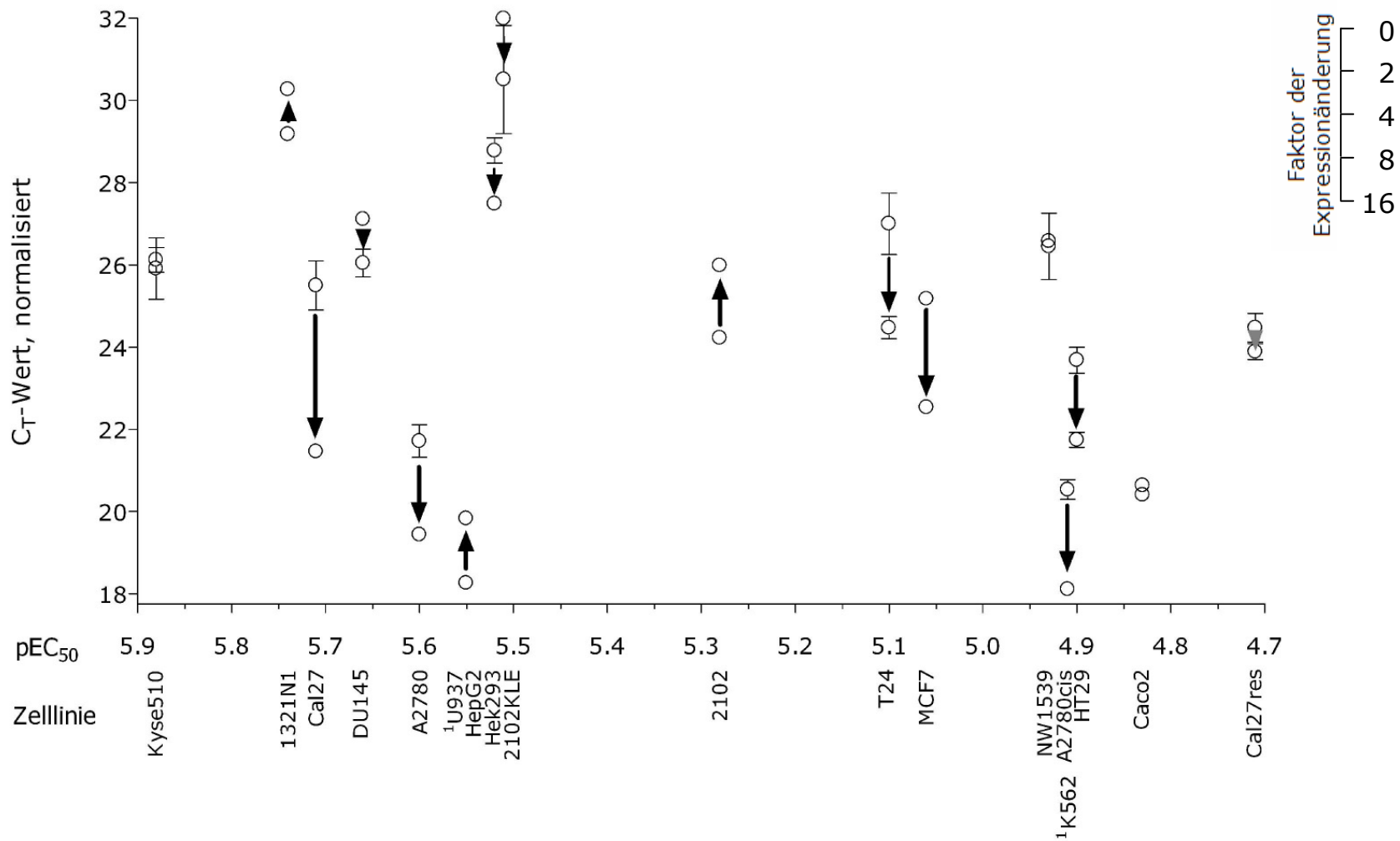
DKK1

Abbildung 4.18 E: Mittels NormIt normierte C_T -Werte von DKK1 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T -Wert der behandelten Probe. \rightarrow = nicht signifikant, \blacktriangleright = $p < 0,05$, \blacktriangleright = $p < 0,01$ und \blacktriangleright = $p < 0,001$.

¹ keine Genexpression detektierbar ($C_T > 40,0$).

Bei der Expression von **DKK1** (siehe Abbildung 4.18 E) fällt auf, dass die beiden Suspensionszelllinien U937 und K562 kein DKK1 exprimieren ($C_T > 40,0$). Der Großteil der anderen Zelllinien reguliert die DKK1-Expression auf Cisplatin-Behandlung hoch. Die größte Hochregulierung findet man bei der Zelllinie Cal27, die DKK1 auf Cisplatin-Behandlung 16fach hochreguliert. Die resistente Zelllinie Cal27res zeigt, ausgehend von etwa gleichen basalen DKK1-Spiegeln wie Cal27, keine geänderte Genexpression auf Cisplatin-Behandlung. Auch zwei weitere resistente Zelllinien, Caco2 und NW1539, zeigen ebenso wie die sensitive Kyse510 keine veränderte Expression von DKK1.

Im Allgemeinen fällt auf, dass die Zelllinien recht unterschiedliche DKK1-Spiegel aufweisen. HepG2 hat basal etwa 13 500mal mehr Kopien der DKK1-mRNA als 2102KLE-Zellen. Die beiden A2780-Zelllinien reagieren wieder sehr ähnlich, die basalen DKK1-Spiegel unterscheiden sich nur etwa um den Faktor 2, und beide Zelllinien regulieren DKK1 auf die Cisplatin-Behandlung etwa 5fach hoch.

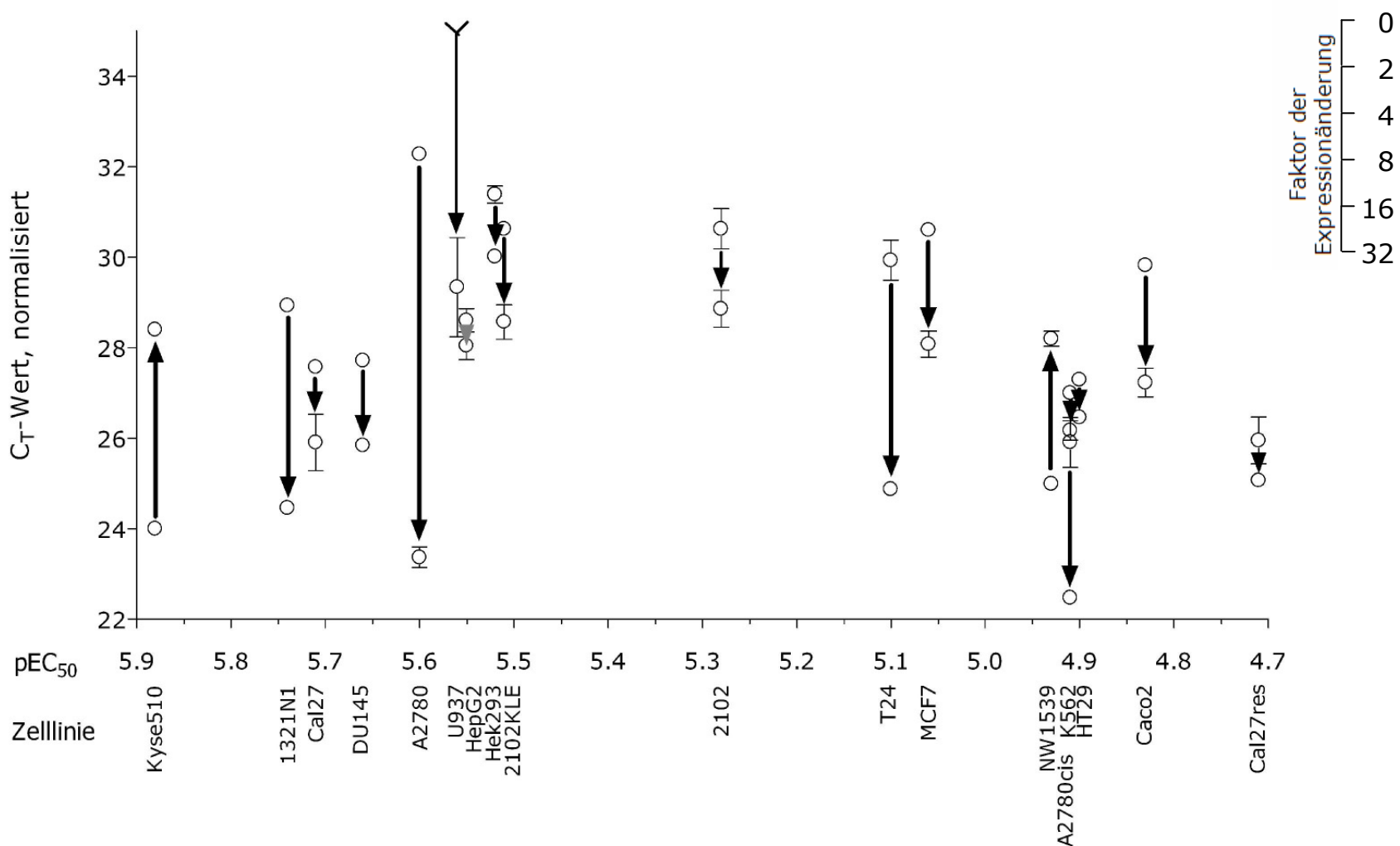
EGR1

Abbildung 4.18 F: Mittels NormIt normierte C_T -Werte von EGR1 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T -Wert der behandelten Probe. \rightarrow = nicht signifikant, \rightarrow = $p < 0,05$, \rightarrow = $p < 0,01$ und \rightarrow = $p < 0,001$.

EGR1 wird mit Ausnahme von zwei Zelllinien auf Cisplatin-Behandlung hochreguliert (siehe Abbildung 4.18 F). Die größte Hochregulierung zeigt die sensitive Zelllinie A2780, von der die Cisplatin-behandelte Probe (C_T -Wert 23,4) 480fach höhere EGR1-Spiegel zeigt als die unbehandelte Probe (C_T -Wert 32,3). Die resistente Zelllinie A2780cis zeigt immerhin noch einen Anstieg der EGR1-Expression um den Faktor 10,8. Bemerkenswert ist jedoch, dass A2780cis basal (C_T -Wert 25,9) etwa 80fach mehr EGR1 bildet als A2780. Ebenfalls eine deutliche Induktion zeigen die Zelllinien 1321N1 (Faktor 22,2) und T24 (Faktor 33,3). Die unbehandelte Zelllinie U937 zeigt keine detektierbare EGR1-Expression, die behandelte Probe wird bei einem korrigierten C_T -Wert von 29,3 detektiert. Dies ist, wenn auch nicht genau zu quantifizieren, eine mindestens 200fache Induktion von EGR1 bei einer Behandlung von U937 mit Cisplatin. HepG2 zeigt als einzige Zelllinie keine signifikante Regulierung von EGR1. Weitere Zelllinien, die EGR1 hochregulieren, zeigen Faktoren bis maximal sechs.

Nur zwei der 18 untersuchten Zelllinien regulieren EGR1 signifikant herunter: NW1539 und Kyse510. Verglichen mit den anderen Zelllinien zeigen diese beiden Zelllinien auch die höchsten Basal-Spiegel (C_T -Werte 24,0 bei Kyse510 und 25,0 bei NW1539). Davon ausgehend zeigt Kyse510 auf die Cisplatin-Behandlung eine 20,6fache und NW1539 eine 9,2fache Abnahme von EGR1.

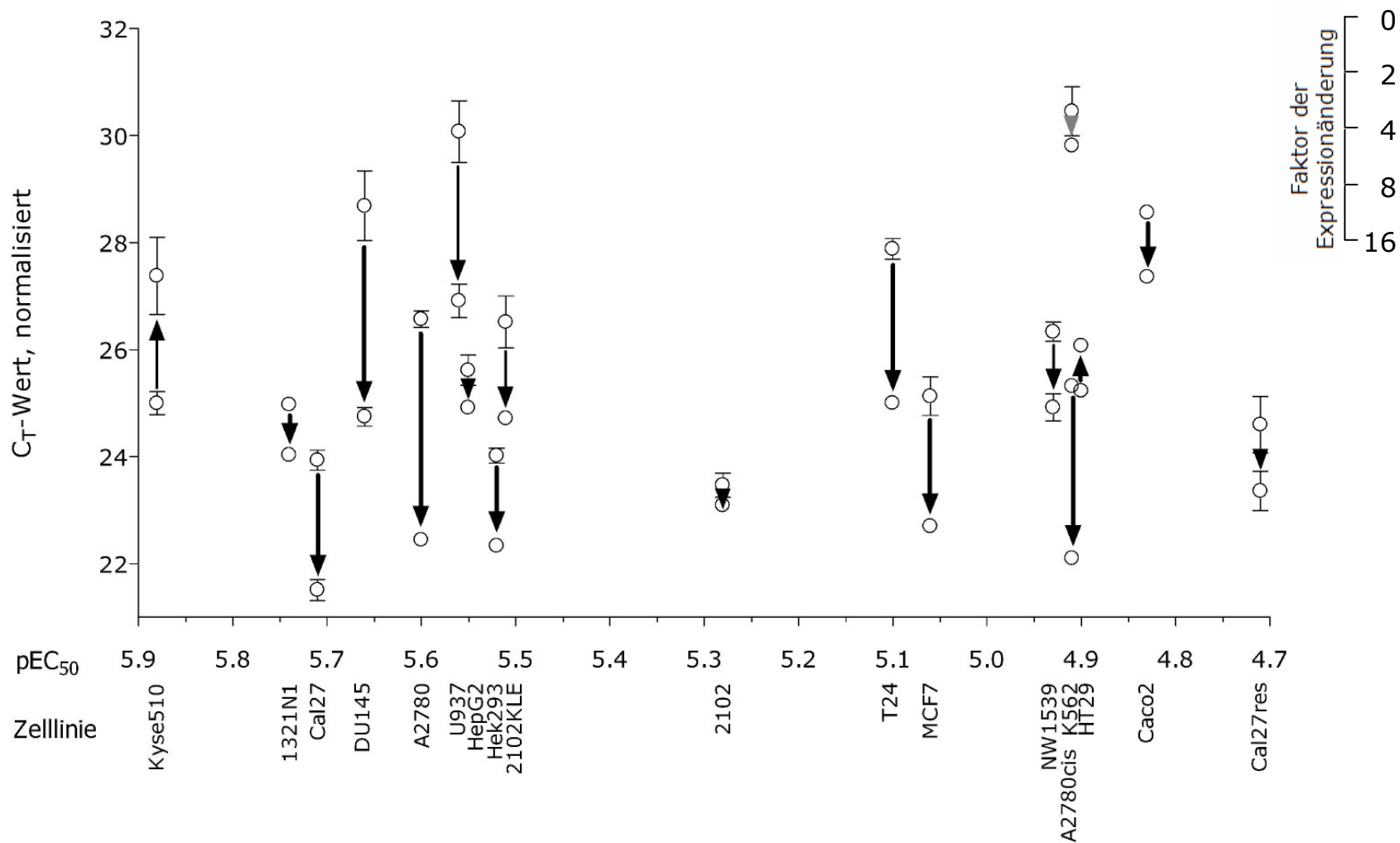


Abbildung 4.18 G: Mittels NormIt normierte C_T -Werte von p53 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T -Wert der behandelten Probe. \rightarrow = nicht signifikant, \rightarrow = $p < 0,05$, \rightarrow = $p < 0,01$ und \rightarrow = $p < 0,001$.

Auch bei der Expression von **p53** (siehe Abbildung 4.18 G) fällt auf, dass alle Zelllinien mit Ausnahme von zwei p53 hochregulieren. Wie bei EGR1 ist es auch hier Kyse510, die p53 um den Faktor 5,2 herunterreguliert, dazu noch HT29 mit einer etwa 2fach geringeren Expression nach Cisplatin-Behandlung. Alle anderen Zelllinien zeigen eine Induktion von p53, die in allen Zelllinien bis auf K562 signifikant ist.

Die stärkste Induktion von p53 zeigen die Zelllinien DU145 (15,4fach), A2780 (17,5fach), T24 (7,4fach) und A2780cis (9,3fach). Ausgehend von etwas verschiedenen Basalwerten (A2780 C_T-Wert 26,6 und A2780cis C_T-Wert 25,3) exprimieren beide A2780-Zelllinien nach Cisplatin-Behandlung gleich viel p53 (C_T-Werte 22,4 bzw. 22,1). Die sensitive Zelllinie Cal27 zeigt, ausgehend von relativ hohen Basalwerten (C_T-Wert 23,9) eine 5,4fache Induktion von p53, die resistente Cal27res hat basal etwas geringere p53-Spiegel (C_T-Wert 24,6) und induziert es nur 2,4fach.

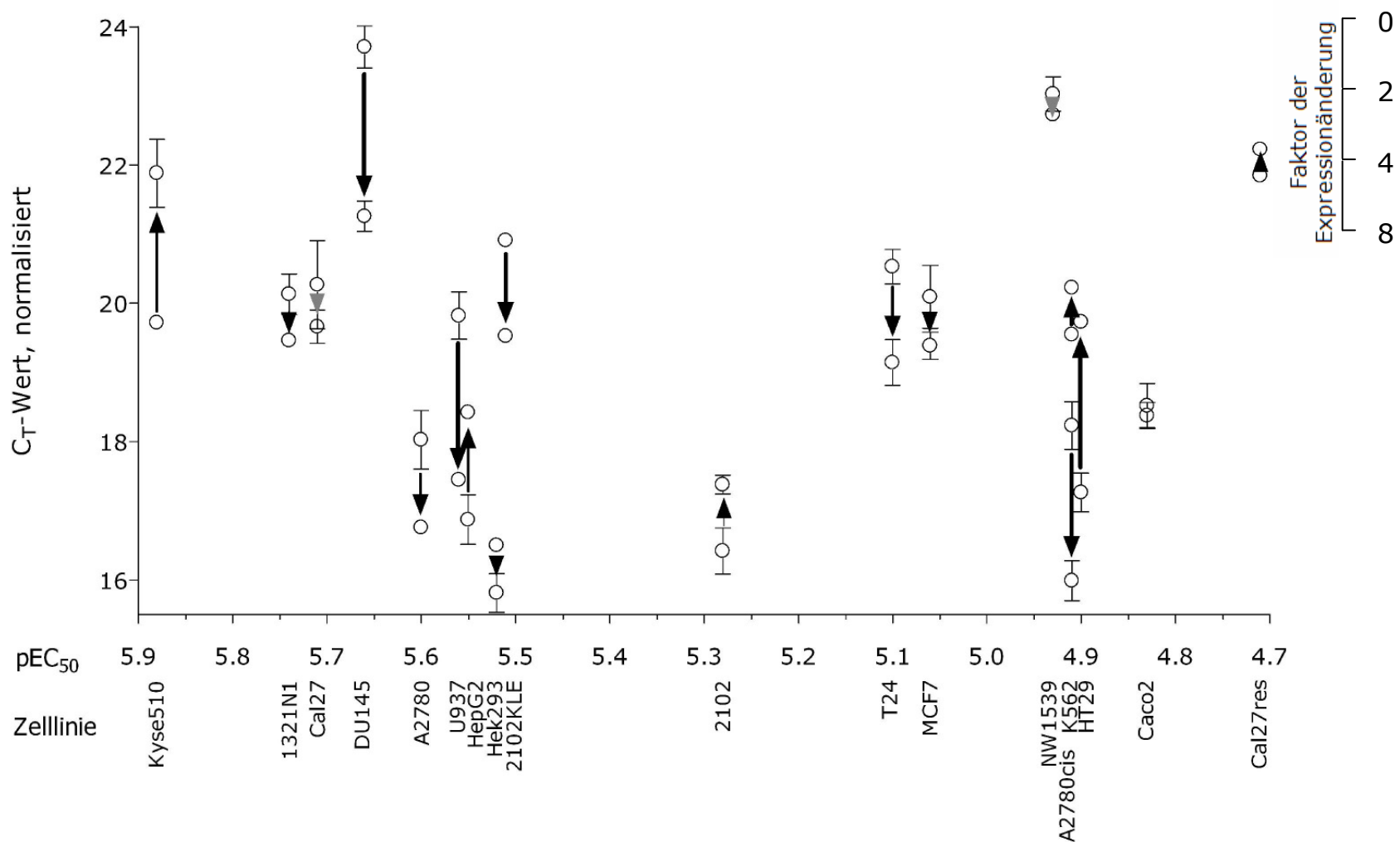


Abbildung 4.18 H: Mittels NormIt Normierte C_T-Werte von RPL5 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T-Wert der behandelten Probe. ➡ = nicht signifikant, ➤ = p < 0,05, ➥ = p < 0,01 und ➦ = p < 0,001.

Betrachtet man die Basal-Spiegel von **RPL5** (siehe Abbildung 4.18 H), unterscheiden sich diese zwischen den verschiedenen Zelllinien maximal 158fach ($\Delta C_T = 7,3$). Die Faktoren, um die die Zelllinien die Expression von RPL5 verändern, sind mäßig, die größten Veränderungen zeigen DU145 (5,5fach hoch) und HT29 (5,6fach herunter). Aber umso unterschiedlicher reagieren die Zelllinien mit der Expression von RPL5 auf die Cisplatin-Behandlung: Acht Zelllinien induzieren RPL5, vier zeigen keine Veränderung der Genexpression und sechs regulieren RPL5 herunter.

Beide Cal-Zelllinien zeigen keine deutliche Änderung. Die sensitive Cal27 hat basal etwas höhere RPL5-Spiegel (C_T -Wert 20,3) und reguliert RPL5 nicht signifikant hoch. Die resistente Cal27res reguliert RPL5 wenig herunter (C_T -Wert 21,8 unbehandelt, C_T -Wert 22,2 behandelt). Die beiden A2780-Zelllinien haben basal etwa gleiche RPL5-Spiegel (C_T -Wert 18,2 bzw. 18,0), und beide induzieren RPL5 leicht: Die sensitive Zelllinie A2780 2,4fach und die resistente A2780cis 4,7fach. Die einzig sonst noch anzumerkende differentielle Regulierung ist bei Kyse510 zu beobachten; diese Zelllinie verringert die RPL5-Expression auf Cisplatin-Behandlung um den Faktor von 4,5.

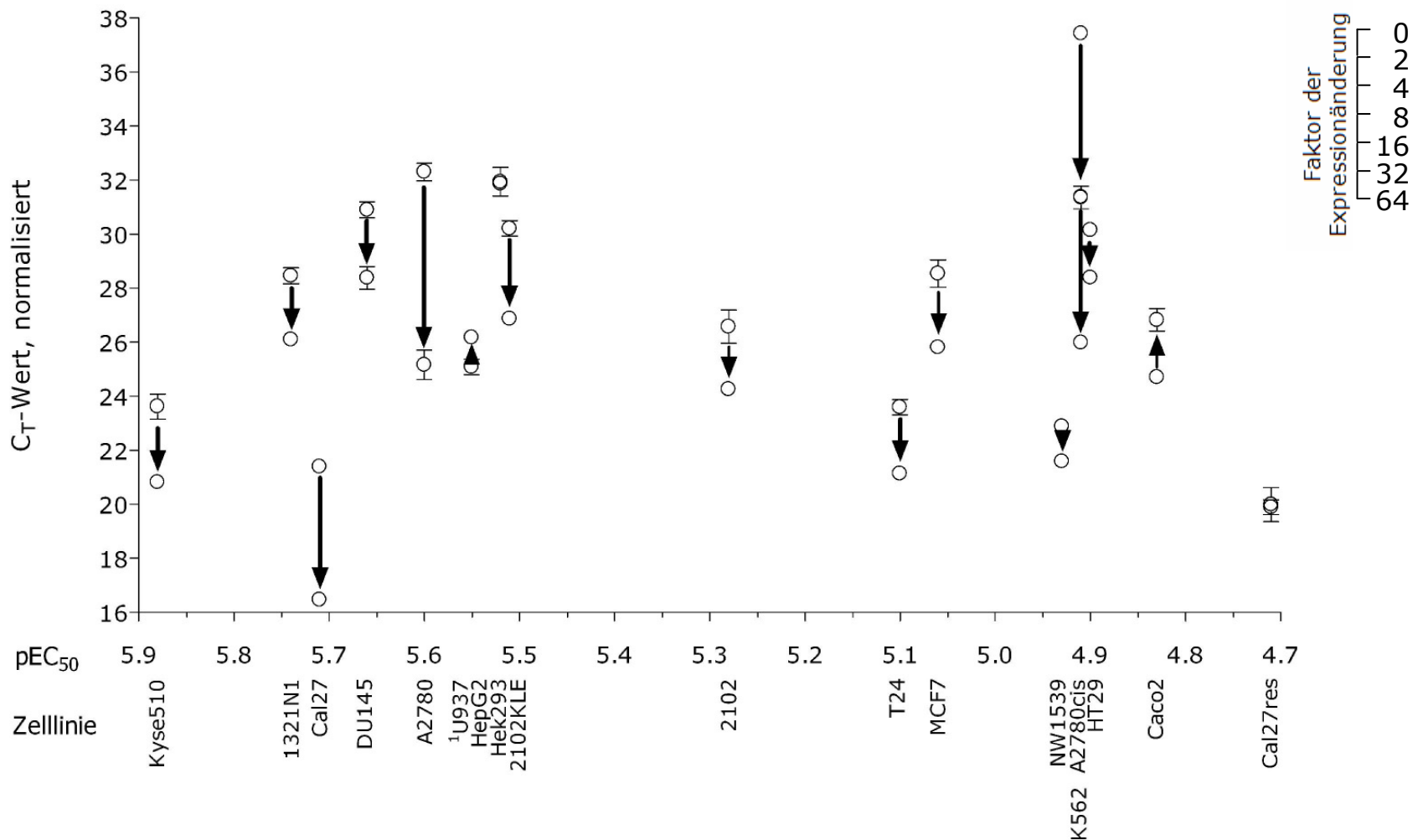
THBS1

Abbildung 4.18 I: Mittels NormIt normierte C_T-Werte von THBS1 in allen Zelllinien. Die Pfeilrichtung gibt die Reaktion der Zelllinie auf Cisplatin an, der Beginn der Pfeils zeigt den Basalzustand, die Pfeilspitze den C_T-Wert der behandelten Probe. ► = nicht signifikant, ► = p < 0,05, ► = p < 0,01 und ► = p < 0,001.

¹ keine Genexpression detektierbar (C_T > 40,0).

THBS1 wird in 13 der 18 Zelllinien durch die Cisplatin-Behandlung induziert (siehe Abbildung 4.18 I). Die Zelllinie U937 zeigt weder vor noch nach Cisplatin-Behandlung eine detektierbare Expression von THBS1, die resistente Zelllinie Cal27res und die relativ sensitive Zelllinie Hek293 zeigen keine Veränderung der Genexpression. Die beiden Zelllinien, die ihre THBS1-Spiegel auf Cisplatin-Behandlung herunterregulieren, sind HepG2 (2,1fach) und Caco2 (4,3fach). Alle anderen Zelllinien regulieren THBS1 zum Teil auf Cisplatin-Behandlung mit großen Faktoren hoch.

Die stärkste Induktion der THBS1-Expression auf Cisplatin-Behandlung erfahren die beiden A2780-Zelllinien. Die sensitive A2780, die basal höhere THBS1-Spiegel (C_T -Wert 32,3) aufweist als die resistente A2780cis (C_T -Wert 37,4), reguliert THBS1 141fach hoch, A2780cis 68fach. Die Zelllinie K562, die denselben Resistenzgrad aufweist wie A2780cis, induziert THBS1 42,2fach und die sensitive Zelllinie Cal27 30,4fach. Eine weitere deutliche Induktion mit einem Faktor 10,2 zeigt die Zelllinie 2102KLE. Ein Drittel der Zelllinien induziert THBS1 auf Cisplatin-Behandlung 5- bis 7fach: Kyse510, 1321N1, DU145, 2102, T24 und MCF7. Eine geringere Induktion zeigen nur die beiden resistenten Zelllinien NW1539 (Faktor 2,5) und HT29 (Faktor 3,4).

Bei den beiden Cal27-Zelllinien fällt auf, dass sie von allen untersuchten Zelllinien die höchsten Basal-Spiegel von THBS1 aufweisen (C_T -Wert 21,4 bei Cal27 und 19,9 bei Cal27res), aber nur Cal27 kann THBS1 auf Cisplatin-Behandlung weiter hochregulieren. Signifikant weniger THBS1 als alle anderen Zelllinien exprimiert die resistente Zelllinie A2780cis. Bei einem direkten Vergleich der Basal- C_T -Werte zwischen A2780cis (37,4) und Cal27res (19,9) exprimiert Cal27res 185 000 Mal mehr THBS1 als A2780cis.

4.3.3 Vergleich der Expressionsdaten

Vergleich der Methoden geNorm und NormIt

Anhand der mittels NormIt korrigierten C_T -Werte ist es möglich, nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode Expressionsfaktoren auszurechnen (siehe Kapitel 3.8.6), die direkt mit Expressionsfaktoren von geNorm (siehe Kapitel 3.11.3) zu vergleichen sind (siehe Abbildungen 4.19 bis 4.21). In zwölf der 18 untersuchten Zelllinien unterscheiden sich die Expressionsfaktoren zwischen geNorm und NormIt maximal um den Faktor 2. Beide Methoden stimmen z. B. sehr gut überein, wenn man die Zelllinie **NW1539** betrachtet (siehe Abbildung 4.19). Sowohl geNorm als auch NormIt enthalten TFR und GUSB als HKG, das dritte HKG von geNorm ist RPLP0, NormIt schließt für beide Proben (behandelt und unbehandelt) noch ACTB, UBE2D2, B2M und HPRT1 ein. Dass bei NormIt sechs von neun potentiellen HKGs als Standards in die Berechnung der Expressionsfaktoren einfließen, spricht dafür, dass die Expression der HKG recht stabil ist. Der Unterschied der Expressionsfaktoren für NW1539 zwischen geNorm und NormIt beträgt 1,14 (in NormIt höher als geNorm) und ist für kein Gen signifikant verschieden (t-Test).

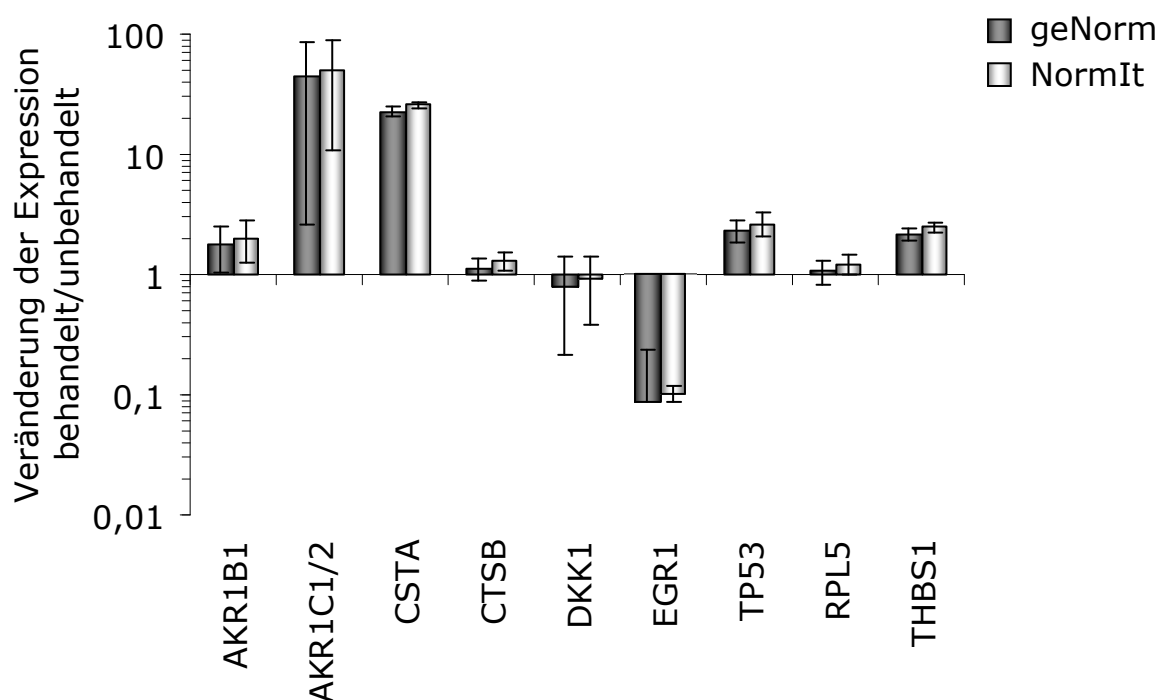


Abbildung 4.19: Vergleich der Methoden geNorm und NormIt am Beispiel der Zelllinie NW1539. Angegeben ist MW ± SD.

Für **Kyse510** ergibt sich die größte Abweichung aller Zelllinien zwischen geNorm und NormIt in der einen Richtung. Die mit NormIt ermittelten Expressionsfaktoren entsprechen nur etwa einem Drittel der Werte der mit geNorm ermittelten Expressionsfaktoren (siehe Abbildung 4.20). geNorm berechnet die Expressionsfaktoren auf Grundlage der Expression von UBE2D2, TFR und PhosA2, NormIt dagegen legt für Kyse510-unbehandelt die Gene ACTB, RPL13A, PhosA2, B2M, HPRT1 und GUSB zugrunde, für Kyse510-behandelt nur ACTB, PhosA2 und HPRT1. Allein PhosA2 wird von beiden Methoden als Standard verwendet. Die mittels geNorm und NormIt ermittelten Expressionsfaktoren unterscheiden sich aber nur für THBS1 signifikant voneinander (t-Test).

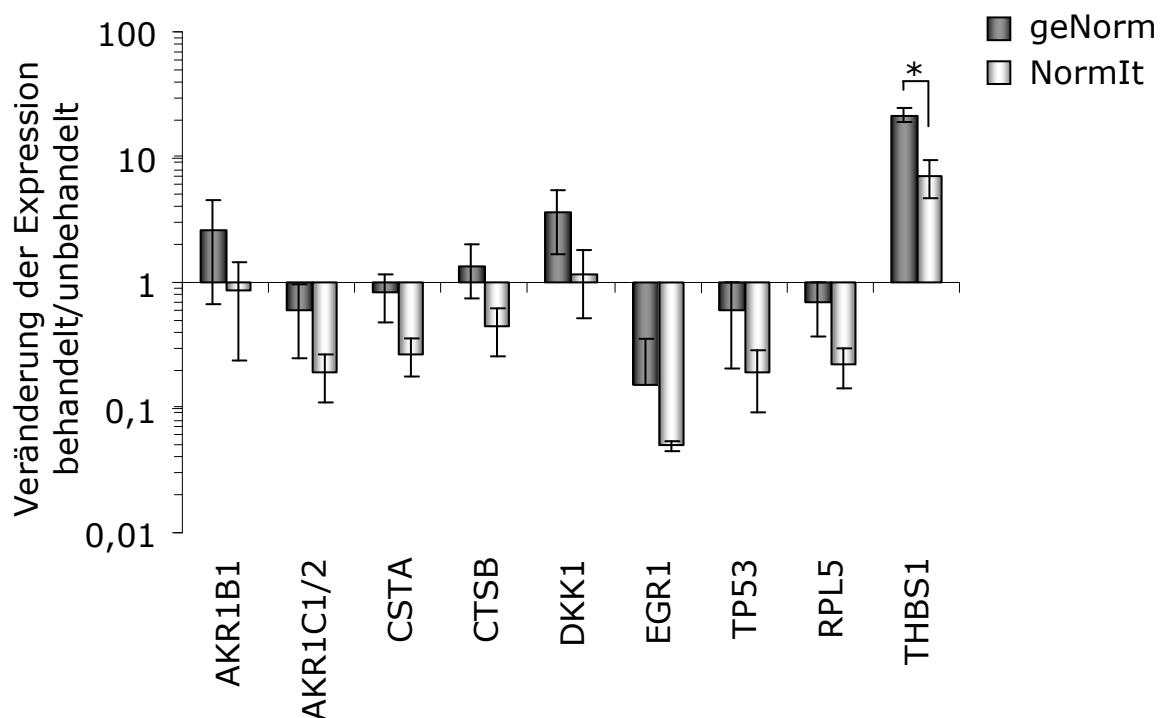


Abbildung 4.20: Vergleich der Methoden geNorm und NormIt am Beispiel der Zelllinie Kyse510. Angegeben ist MW \pm SD.

Anders sieht es für **A2780cis** aus, dargestellt in Abbildung 4.21. Für diese Zelllinie ergeben sich mit NormIt 4,8fach größere Expressionsfaktoren als mit geNorm. geNorm verwendet für A2780cis-unbehandelt und A2780cis-behandelt die Gene B2M, RPLP0 und RPL13A als HKGs, NormIt jedoch für A2780cis-unbehandelt PhosA2, HPRT1 und TFR und für A2780cis-behandelt UBE2D2, HPRT1 und TFR. Aufgrund dieser ganz verschiedenen HKGs kommt es zu solch einer Verschiebung der Expressionsfaktoren.

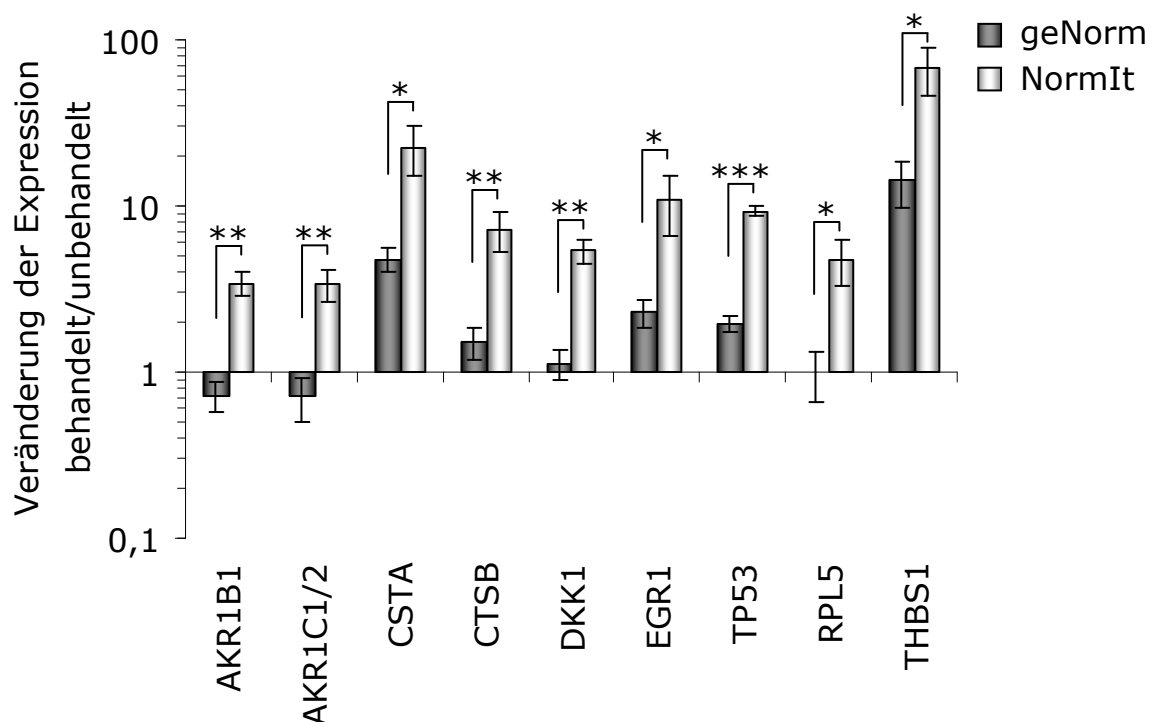


Abbildung 4.21: Vergleich der Methoden geNorm und NormIt am Beispiel der Zelllinie A2780cis. Für NormIt ergeben sich 4,8fach größere Expressionsfaktoren verglichen mit geNorm.

Die Ergebnisse der meisten untersuchten Zelllinien zeigen zwischen den Auswertemethoden geNorm und NormIt keine signifikanten Unterschiede. Die extreme Abweichung in der Zelllinie A2780cis ist hier die Ausnahme. Um zu klären, welche der beiden Auswertemethoden für A2780cis realistischere Expressionsdaten liefert, muss zuerst eine Validierung von NormIt erfolgen.

Vergleich der Genexpression in den Zellpaaren Cal27 und A2780

Um einen besseren Überblick über die Reaktionen der Zelllinien Cal27 und Cal27res auf die Cisplatin-Behandlung zu erhalten, sind in Abbildung 4.22 noch einmal die Faktoren der differentiellen Expression aller Gene zusammengestellt. Abbildung 4.22 A zeigt die Auswertung nach geNorm, Abbildung 4.22 B die Auswertung nach NormIt. Zwischen beiden Auswertemethoden ist einzig die Expression von p53 zwischen Cal27 und Cal27res nach NormIt signifikant, nach geNorm nicht. Alle anderen Genexpressionen sind vergleichbar. Tendenziell reagieren beide Zelllinien ähnlich auf die Cisplatin-Behandlung, mit Ausnahme der Gene CSTA (nicht signifikant) und CTSB. Die Induktion von AKR1B1, DKK1 und THBS1 auf Cisplatin-Behandlung ist jeweils in Cal27 signifikant stärker als in Cal27res.

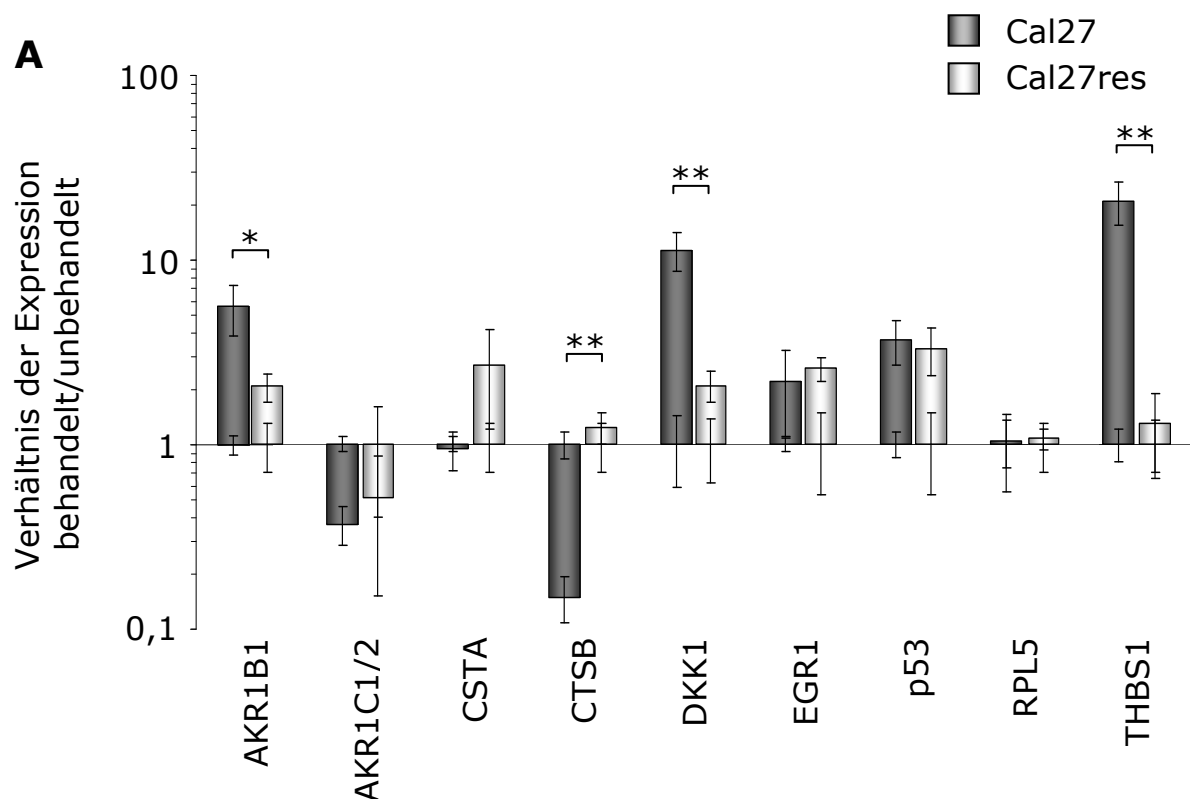


Abbildung 4.22 A. Legende siehe nächste Seite.

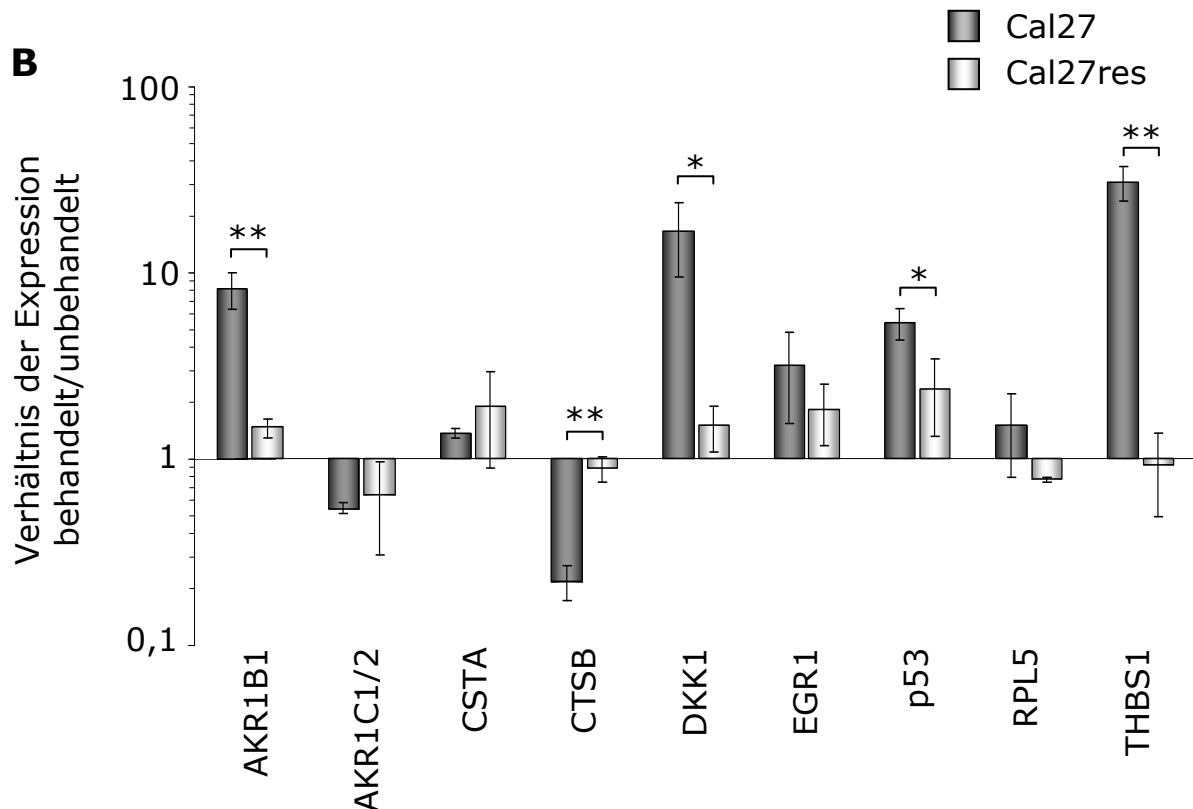


Abbildung 4.22: Genexpression der beiden Cal27-Zelllinien: Einfluss der Cisplatin-Behandlung nach geNorm (A) und NormIt (B). Verhältnis der Genexpressionen der mit Cisplatin behandelten Probe im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Expression = $1 \pm \text{SD}$). Eingezeichnet sind die Fehler (SD) ermittelt aus Duplikaten bezogen auf mindestens 3 HKGs. Signifikante Unterschiede beider Proben mit * = $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$ (t-Test).

Folgende Fragestellungen sind ebenfalls interessant und zu klären: Wie unterscheiden sich die beiden Zelllinien im Basalzustand (ohne Cisplatin-Behandlung) und nach Cisplatin-Behandlung?

Der basale Unterschied beider Zelllinien ist in Abbildung 4.23 A (nach geNorm) und Abbildung 4.23 B (nach NormIt) dargestellt. Im Basalzustand der Zellen (unbehandelt) sind signifikante Unterschiede bei AKR1B1 (in Cal27res hochreguliert), AKR1C1/2 (in Cal27res herunterreguliert), CSTA und CTSB (in Cal27res herunterreguliert) und THBS1 (in Cal27res hochreguliert) zu erkennen. Dies gilt sowohl für die Auswertung nach geNorm als auch nach NormIt. DKK1 und EGR1 sind ebenfalls in Cal27res überexprimiert, jedoch nicht signifikant.

Ein wenig anders sieht es aus, wenn man die beiden Zelllinien jeweils nach der Cisplatin-Behandlung betrachtet, was zum besseren Vergleich ebenfalls in Abbildung 4.23 dargestellt ist. Der Unterschied der Expression, der im Basalzustand zu finden war, scheint sich, wenn man die Auswertung nach geNorm betrachtet (siehe Abbildung 4.23 A), tendenziell eher auszugleichen. Zumindest bei AKR1B1, CSTA und DKK1 geht der Faktor der differentiellen Expression deutlich zurück, bei CTSB und THBS1 nivelliert sich der Unterschied sogar ganz. Bei AKR1C1/2, EGR1, RPL5 und p53 zeigen sich gleiche Expressionsfaktoren wie im unbehandelten Zustand. Diese Aussage trifft für die Auswertung nach NormIt (siehe Abbildung 4.24 B) nur bedingt zu, nämlich für die Gene AKR1C1/2, CSTA, CTSB und EGR1. Für AKR1B1, DKK1 und THBS1 kommt es zu einer Änderung der Expressionsrichtung zwischen Cal27 und Cal27res. Ohne Cisplatin-Behandlung zeigte jeweils die resistente Zelllinie Cal27res die größere Expression dieser Gene, auf Cisplatin-Behandlung ist es jeweils Cal27. Für p53 und RPL5 kommt es auf Cisplatin-Behandlung jeweils zu einer (nicht signifikant) weiter gesteigerten Expression der Gene in Cal27.

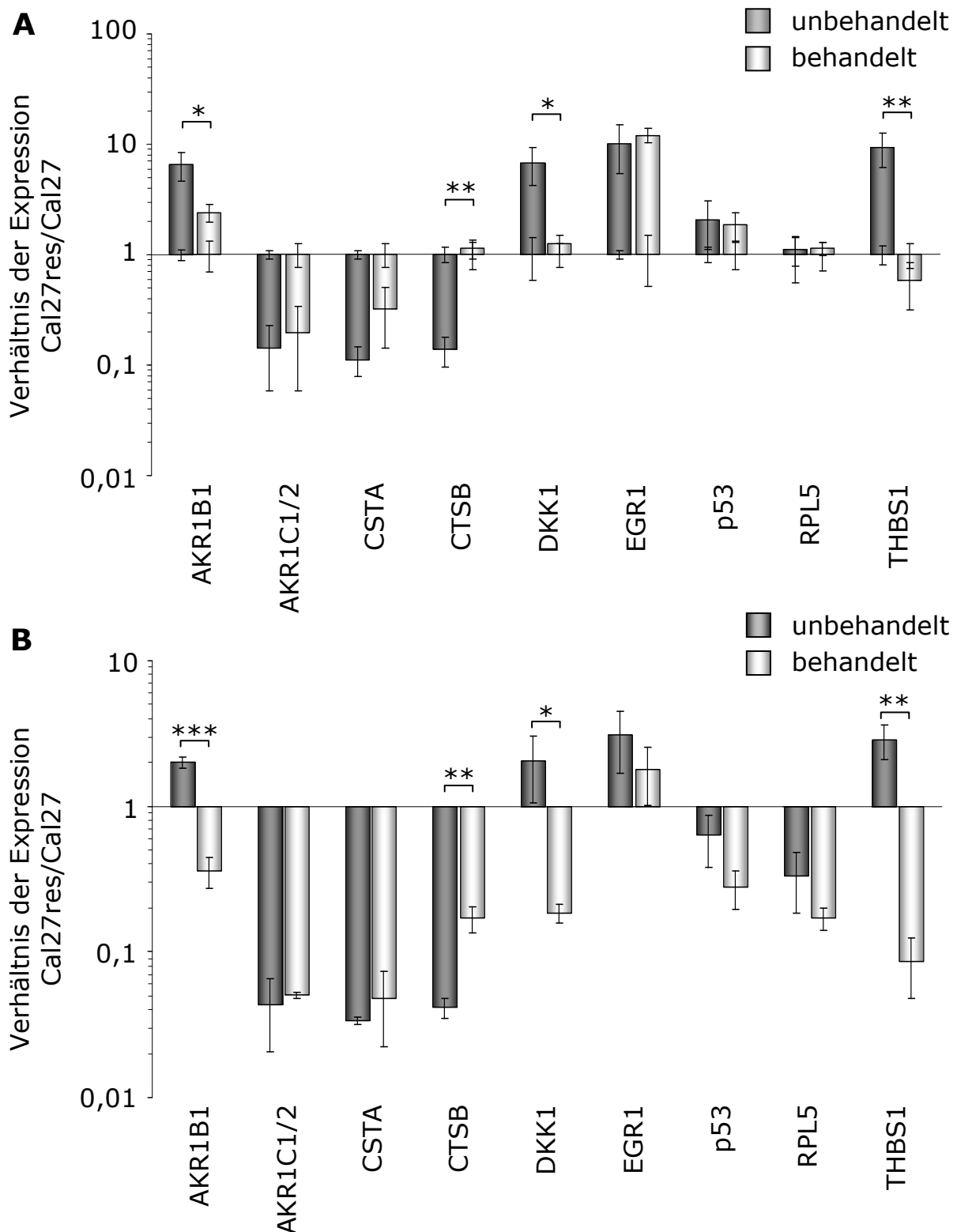


Abbildung 4.23: Genexpression der beiden Cal27-Zelllinien: Einfluss der Resistenz. Verhältnis der Genexpression Cal27res zu Cal27 im unbehandelten Zustand und nach Inkubation mit Cisplatin ausgewertet nach geNorm (A) und NormIt (B). Signifikante Unterschiede beider Proben mit * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ (t-Test).

Der Vergleich der beiden Zelllinien A2780 und A2780cis wird im Folgenden nur nach der Auswertung nach geNorm dargestellt. Auch die beiden A2780-Zelllinien reagieren ähnlich auf die Behandlung mit Cisplatin (siehe Abbildung 4.24). Einzig bei AKR1C1/2 reagiert die sensitive A2780 mit einer Überexpression, die resistente A2780cis reguliert AKR1C1/2 hingegen herunter. Des Weiteren unterscheidet sich der Faktor, um den EGR1 überexprimiert wird, bemerkenswert: In A2780 ist EGR1 136fach überexprimiert, in A2780cis nur noch 2fach.

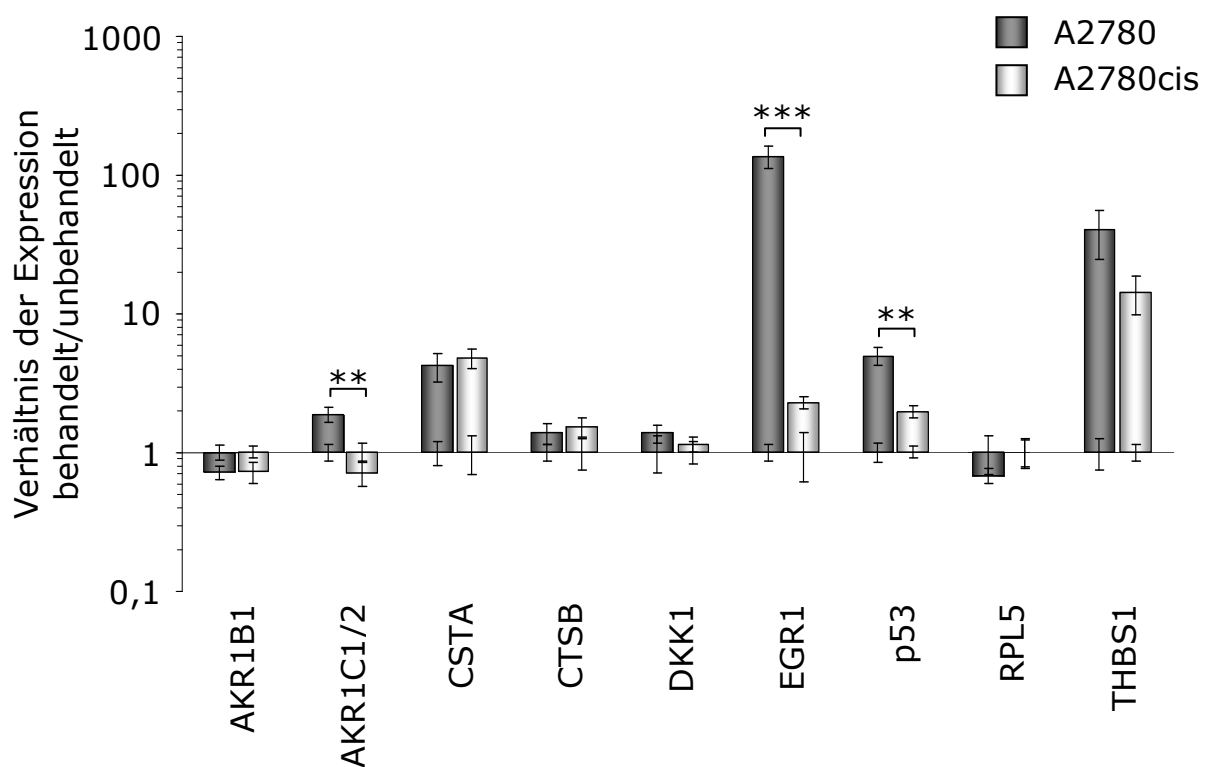


Abbildung 4.24: Genexpression der beiden A2780-Zelllinien: Einfluss der Cisplatin-Behandlung nach geNorm. Verhältnis der Genexpressionen der mit Cisplatin behandelten Probe im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Signifikante Unterschiede beider Proben mit ** $p < 0,01$ und * $p < 0,001$ (t-Test).**

Wie für das Zungenkarzinom Cal27 soll auch die Expression der Gene zwischen den beiden unbehandelten und den mit Cisplatin behandelten A2780-Zelllinien verglichen werden (siehe Abbildung 4.25).

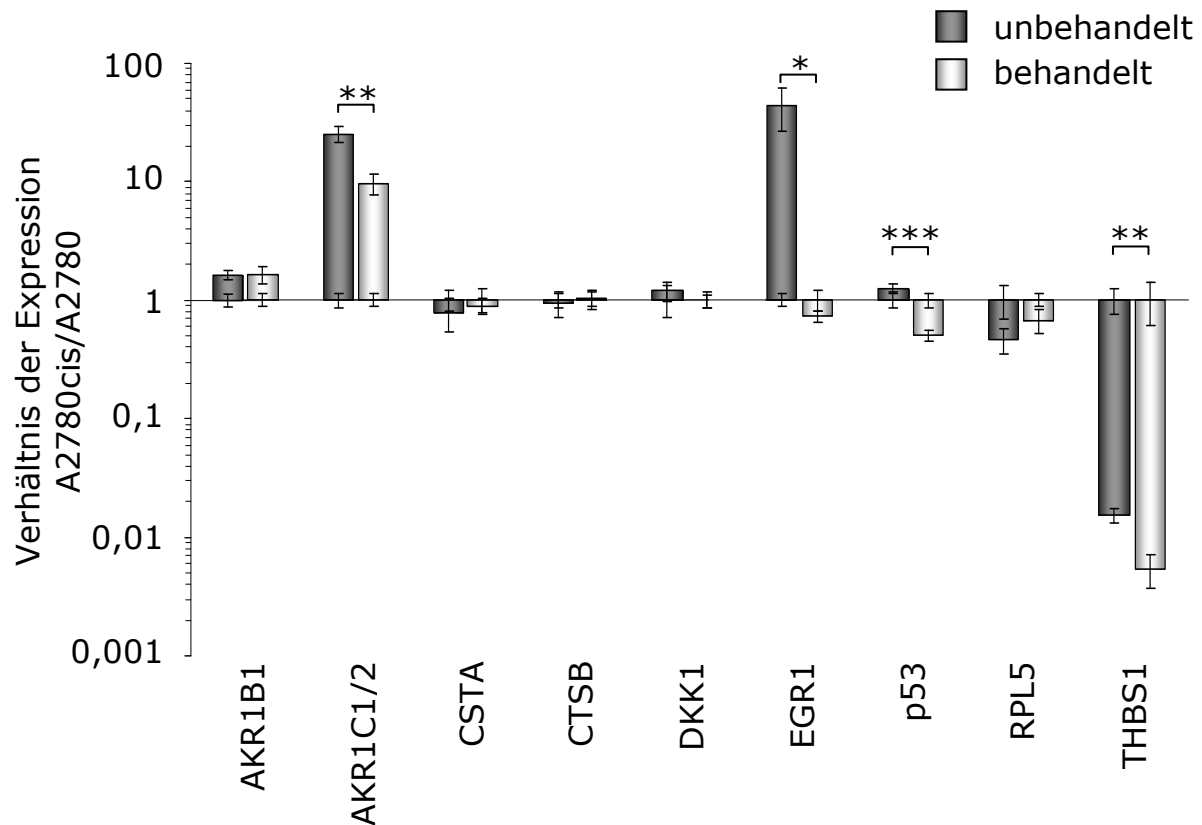


Abbildung 4.25: Genexpression der beiden A2780-Zelllinien: Einfluss der Resistenz. Verhältnis der Genexpression A2780cis zu A2780 im unbehandelten Zustand und nach Inkubation mit Cisplatin ausgewertet nach geNorm. Signifikante Unterschiede beider Proben mit * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und * $p > 0,001$ (t-Test).**

Im Basalzustand (unbehandelt) zeigen sich zwischen beiden Zelllinien besonders bei AKR1C1/2 (Faktor 25 in A2780cis überexprimiert), EGR1 (Faktor 43 in A2780cis überexprimiert) und bei THBS1 (Faktor 67 in A2780cis herunterreguliert) signifikante Unterschiede. Die beiden mit Cisplatin behandelten Zelllinien zeigen den Unterschied in der EGR1-Expression nicht mehr, der Unterschied in der THBS1-Expression wird noch deutlicher: In A2780cis ist THBS1 um den Faktor 200 im Vergleich zu A2780 herunterreguliert.

4.4 DKK1-Sekretion von Cal27-Zelllinien

4.4.1 Etablierung eines DKK1-ELISA

Mit Hilfe des kommerziell erhältlichen DKK1-Antikörpers der Firma R&D Systems war es möglich, einen *Touch Down*-ELISA zu etablieren. Der Vorteil dieses *Touch Down*-ELISA ist die Verwendung eines einzigen Antikörpers, da die Antigene direkt an die Mikrotiterplatte gebunden werden. Eine Kalibriergerade mit $R^2 = 0,9846$ ist exemplarisch in Abbildung 4.26 dargestellt.

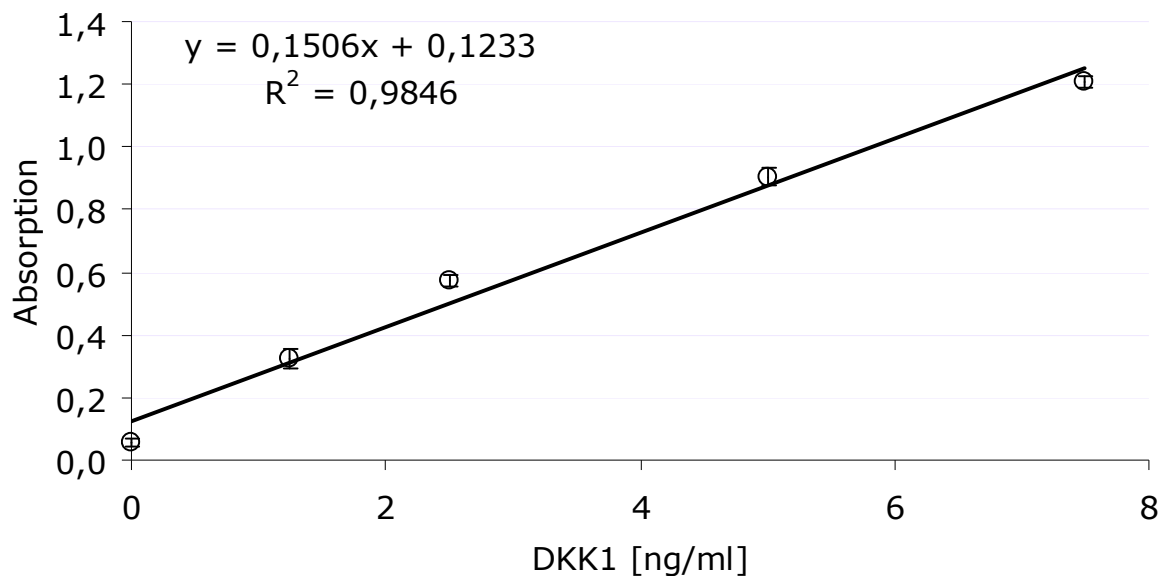


Abbildung 4.26: Exemplarisch dargestellte Kalibriergerade eines DKK1-ELISA. Dargestellt sind $MW \pm$ mittlere Abweichung der Mittelwerte aus jeweils 2 Replikaten.

4.4.2 DKK1-Sekretion von Cal27 und Cal27cis

DKK1, eines der Kandidatengene der SSH, wurde für weitere Studien ausgewählt, da es als Antagonist des Wnt/ β -Catenin-Signalweges einen interessanten Ansatzpunkt für die Untersuchung des Phänomens der Cisplatinresistenz bot. Eine detaillierte Einführung in den Wnt/ β -Catenin-Signalweg gibt Kapitel 5.3. Außerdem war ein kommerziell erhältlicher DKK1-Antikörper auf dem Markt, der für die Etablierung eines DKK1-ELISA geeignet war. Mit Hilfe dieses DKK1-ELISA (siehe Kapitel 3.14) konnte gezeigt werden, dass die sensitive Zelllinie Cal27 etwa 2,5fach höhere DKK1-Spiegel im Nährmedienüberstand der Zellen nach einer Kultivierung über 24 h aufweist als die resistente Zelllinie Cal27cis (siehe Abbildung 4.27). Dies bestätigt das Ergebnis der SSH. Die SSH zeigte DKK1 als Kandidatengen, das nach Cisplatin-Behandlung in Cal27 im Vergleich zu Cal27cis überexprimiert ist. Der in Abbildung 4.28 gezeigte ELISA wurde ohne Cisplatin-Behandlung durchgeführt, und auch hier - im Basalzustand der Zellen - zeigt sich eine signifikant höhere Sekretion von DKK1 in das Nährmedium von Cal27 im Vergleich zu der Cisplatin-resistenten Subzelllinie Cal27res.

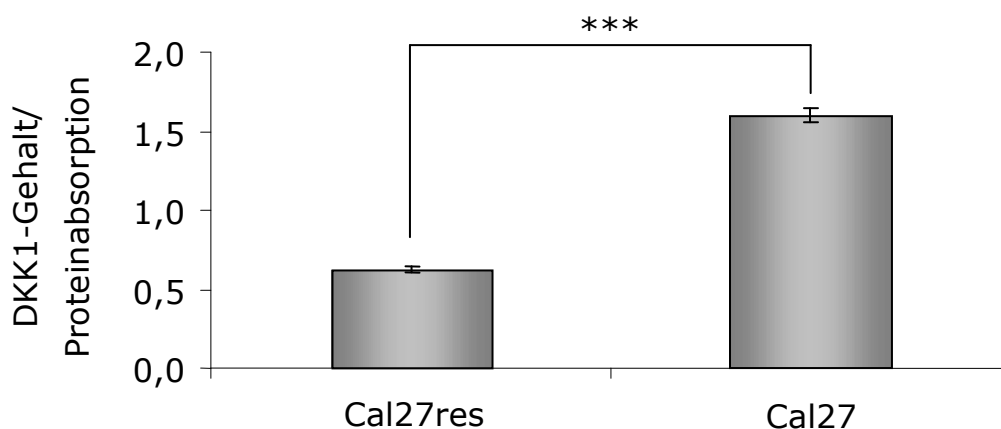


Abbildung 4.27: Vergleich der DKK1-Sekretion in den Nährmedienüberstand der beiden nativen Cal27-Zelllinien nach 24stündiger Kultivierung. MW \pm mittlere Abweichung der Mittelwerte aus je 2 Replikaten, * = $p < 0,001$ (t-Test). Der DKK1-Gehalt wurde bezogen auf die SRB-Absorption der Zellproteine.**

Auch die beiden als Kontroll-Zelllinien für die später erwähnten DKK1-Überexpressionsklone etablierten Zelllinien Cal27-Leer und Cal27res-Leer zeigen, dass Cal27-Leer 2,3fach höhere DKK1-Spiegel im Nährmedium aufweist als Cal27res-Leer (siehe Abbildung 4.28).

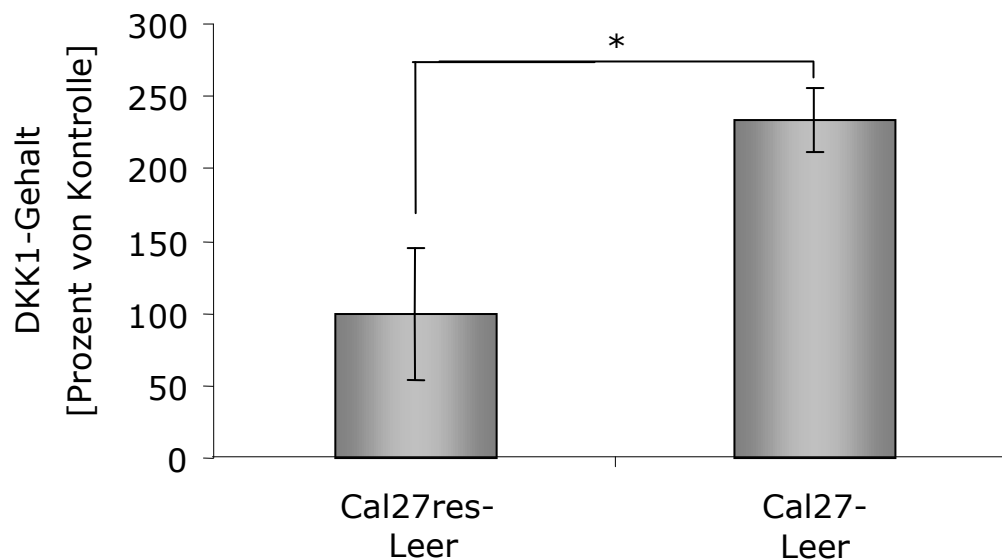


Abbildung 4.28: Vergleich der Leervektor-Klone Cal27res-Leer und Cal27-Leer (n = 3). Als Kontrolle wurden die resistente Zelllinie Cal27res-Leer gleich 100 % gesetzt und die entsprechende sensitive dazu ins Verhältnis gesetzt. Angegeben ist jeweils MW \pm mittlere Abweichung der Mittelwerte aus je 2 Replikaten * = $p < 0,05$, * = $p < 0,001$ (t-Test). Standardisiert auf parallel gemessene Zellzahlen (6-Well).**

4.4.3 Stressbedingte DKK1-Sezernierung in Cal27-Zelllinien

Cisplatin-Behandlung

Welchen Einfluss eine Behandlung der Zellen mit Cisplatin auf die DKK1-Sekretion hat, wurde an den beiden Leervektor-transfizierten Kontroll-Zelllinien untersucht (Abbildung 4.29). Der Klon Cal27-Leer zeigte bereits nach 24 h einen signifikanten 1,9fachen Anstieg des DKK1-Gehalts im Nährmedium überstand der mit Cisplatin behandelten Zellen (127 ± 22 % unbehandelt gegenüber 242 ± 34 % $10 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt). Dieser Unterschied war nach 48 h noch ausgeprägter, die mit Cisplatin behandelten Zellen haben 2,5fach mehr DKK1 ins Nährmedium sekretiert als die unbehandelten (136 ± 42 % unbehandelt gegenüber 336 ± 61 % $10 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt, siehe Abbildung 4.29 A). Auch bei dem Kontroll-Klon Cal27res-Leer zeigt sich auf Cisplatin-Behandlung eine verstärkte DKK1-Sekretion im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Jedoch ist dieser Effekt zeitlich verzögert und erst nach 48 h signifikant (Faktor 1,9, 87 ± 16 % unbehandelt gegenüber 161 ± 23 % $10 \mu\text{M}$ Cisplatin behandelt, siehe Abbildung 4.29 B).

Zu beachten ist jedoch, dass Cal27-Leer mit einer etwa 5fachen EC_{50} ($10 \mu\text{M}$) an Cisplatin behandelt worden ist, $10 \mu\text{M}$ Cisplatin für den resistenten Klon aber nur etwa einer 0,5fachen EC_{50} entsprechen. Ob dieses unterschiedliche Ausmaß der verstärkten DKK1-Sekretion beider Zelllinien nach Cisplatin-Behandlung auf diese in Bezug zu ihrem Resistenzgrad unterschiedliche Cisplatin-Konzentration zurückzuführen ist, bleibt offen. Dazu wären weitere Versuche mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen erforderlich.

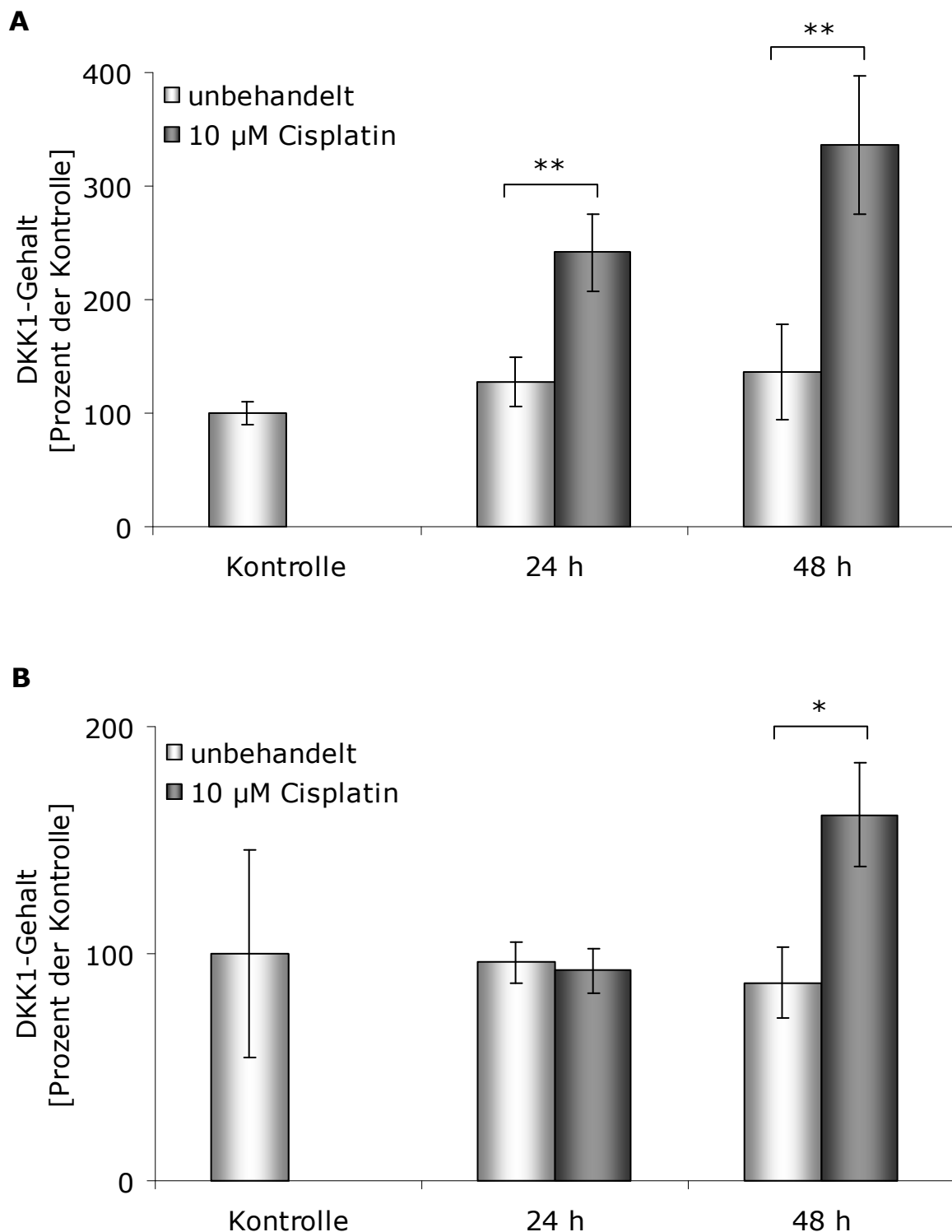


Abbildung 4.29: Induktion der DKK1-Sezernierung durch Cisplatin-Behandlung am Beispiel der Klone Cal27-Leer (A) und Cal27res-Leer (B). Die gemessenen Werte wurden auf die Zellzahl standardisiert. Als Kontrolle wurde der DKK1-Gehalt (DKK1/Zellzahl) im Nährmedienüberstand der unbehandelten Proben jedes Klons nach dem Anwachsen über Nacht (Zeitpunkt 0 h) als 100 % gesetzt. MW \pm SD aus 3 Replikaten, * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ (t-Test).

Verbrauchtes Nährmedium

Die DKK1-Sekretion der beiden Zelllinien Cal27-Leer und Cal27res-Leer wurde über vier Tage beobachtet (siehe Abbildung 4.30). Dazu wurden 3 000 Zellen pro Well in fünf 96-Well-Platten ausgesät und über Nacht anwachsen gelassen. Als Kontrolle wurde die DKK1-Konzentration der Nährmedienüberstände nach dem Anwachsen definiert (Zeitpunkt 0 h). In weiteren 24h-Abständen wurden die Nährmedien-Überstände gesammelt und mittels DKK1-ELISA auf ihren DKK1-Gehalt analysiert. Dazu wurde der Gehalt der Kontrollprobe (DKK1 bezogen auf Zellzahl parallel ausgesähter Zellen) des Klonen Cal27res als 100 % gesetzt und die DKK1-Gehalte der weiteren Proben darauf bezogen.

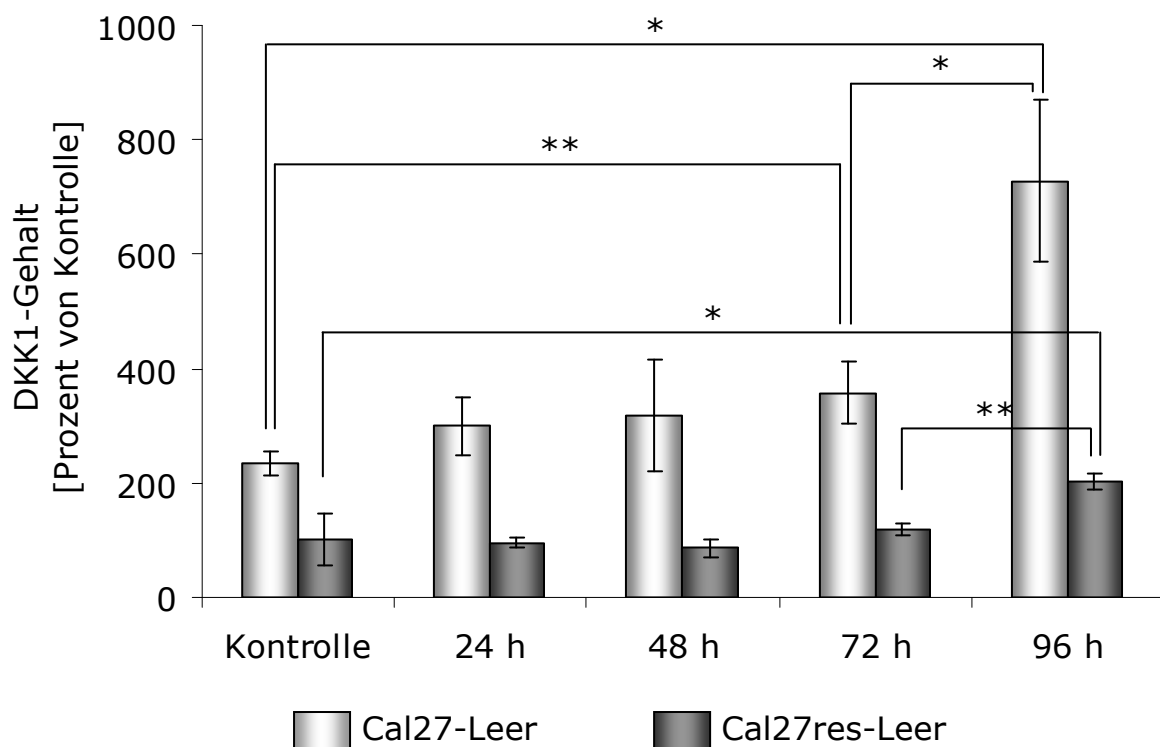


Abbildung 4.30: DKK1-Kinetik der Klone Cal27-Leer und Cal27res-Leer über vier Tage. Der DKK1-Gehalt (DKK1/Zellzahl) der Kontroll-Probe (Zellen nach dem Anwachsen zum Zeitpunkt 0 h) der Zelllinie Cal27res-Leer wurde gleich 100 % gesetzt und alle weiteren Proben darauf bezogen. MW \pm SD aus drei Replikaten. * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$ (t-Test).

Die Zelllinie Cal27-Leer zeigte über die ersten 48 h nach dem Anwachsen keinen signifikanten Anstieg des DKK1-Gehaltes im Nährmedium. Erst der

DKK1-Gehalt nach 72 h ist signifikant verschieden von der Kontrolle (Zellen nach dem Anwachsen zum Zeitpunkt 0 h), ebenso nach 96 h ($311 \pm 60 \%$, Kontrolle: $243 \pm 22 \%$, 96h-Wert: $728 \pm 141 \%$). Dieses Phänomen des signifikanten Anstiegs des DKK1-Gehaltes zeigte sich in der resistenten Zelllinie Cal27res (auf $203 \pm 14 \%$ bezogen auf die Kontrolle) erst nach 96 h. Wie zuvor bei der Cisplatin-Behandlung der Zellen beobachtet, scheint die resistente Zelllinie Cal27res-Leer auch hier zeitverzögert zu reagieren. Die zugehörigen Werte und errechneten Signifikanzen sind in Tabelle 4.9 angegeben.

Tabelle 4.9: Vergleich des Gehalts (DKK1 bezogen auf Zellzahl) an DKK1 in der Kontroll-Probe (Cal27res-DKK1 zum Zeitpunkt 0 h) bzw. der 72h-Probe mit der 96h-Probe. Der DKK1-Gehalt der Kontroll-Probe wurde gleich 100 % gesetzt und alle weiteren Proben darauf bezogen.

Zelllinie	96h-Wert	Kontrolle	Signifi- kanz	72h-Wert	Signifi- kanz
Cal27-Leer	$728 \pm 141 \%$	$243 \pm 22 \%$	$p = 0,042$	$357 \pm 54 \%$	$p = 0,013$
Cal27res- Leer	$203 \pm 14 \%$	$100 \pm 46 \%$	$p = 0,021$	$118 \pm 11 \%$	$p = 0,001$

Auch hier konnte zwischen der resistenten Zelllinie Cal27res-Leer und der sensitiven Zelllinie Cal27-Leer ein Unterschied des DKK1-Gehalts im Nährmedium zum Zeitpunkt 0 h (also nach dem Anwachsen der Zellen über Nacht) von dem Faktor 2 bestätigt werden. Nach einer Kultivierung der Zellen von mehr als 100 h (96 h plus Anwachsen über Nacht) in dem selben Nährmedium sind die Zellen zum einen konfluent, zum anderen ist aber auch das Kulturmedium aufgebraucht. Durch diesen Mangel scheint es sowohl in der sensitiven Zelllinie Cal27-Leer als auch, wenn auch weniger stark ausgeprägt, in der resistenten Zelllinie Cal27res-Leer zu einer verstärkten Sezernierung von DKK1 zu kommen. In wie weit dies auf einen Mangel an Wachstumsfaktoren im Nährmedium, die durch das FKS gestellt werden, zurückzuführen ist, sollte das folgende Experiment zeigen.

Serumentzug

Um den Einfluss des Serumentzuges, also der Kultivierung der Zellen ohne Zusatz von 10 % FKS zum Nährmedium, auf die DKK1-Sezernierung zu bestimmen, wurden 4 000 Zellen pro Well einer 96-Well-Platte über Nacht anwachsen gelassen. Dann wurden die Zellen mit frischem Nährmedium, welches entweder kein FKS (- FKS) bzw. 10 % FKS (+ FKS) enthielt, versetzt. Nach 24 h wurden die Nährmedienüberstände auf ihren Gehalt an DKK1 mittels DKK1-ELISA untersucht und die ermittelten DKK1-Mengen auf die mittels SRB-Anfärbung der 96-Well-Platten ermittelten Proteinmengen bezogen. Der entsprechende DKK1-Gehalt der Zelllinie Cal27res mit FKS wurde als 100 % gesetzt und die anderen Proben wurden darauf bezogen (siehe Abbildung 4.31).

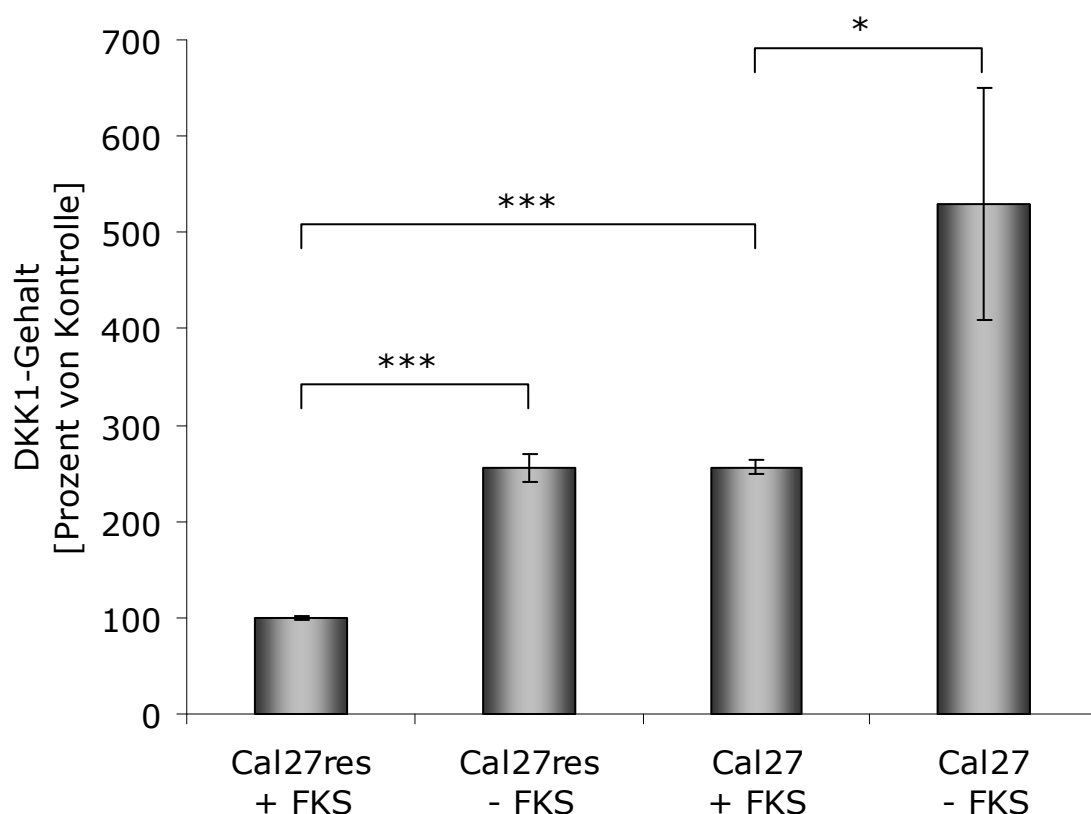


Abbildung 4.31: Einfluss des Serumentzuges auf die DKK1-Sezernierung der beiden nativen Cal27-Zelllinien Cal27 und Cal27res. MW \pm mittlere Abweichung der Mittelwerte aus jeweils zwei Replikaten. * = $p < 0,05$, * = $p < 0,001$ (t-Test). Der DKK1-Gehalt wurde bezogen auf die SRB-Absorption der Zellproteine.**

Es zeigte sich zum Einen, dass beide Zelllinien unter Serumentzug mehr als die doppelte Menge DKK1 sezernierten wie die mit FKS kultivierten Proben (Cal27res 255 ± 15 % (- FKS) zu 100 ± 3 % (+ FKS), Cal27 529 ± 121 % (- FKS) zu 255 ± 7 % (+ FKS)). Zum Anderen sezernierten die sensitiven Cal27 sowohl unter Serumentzug als auch während der Kultivierung mit 10 % FKS in den hier betrachteten 24 h mehr als doppelt so viel DKK1 pro Protein wie die resistenten Cal27res.

Andere Zytostatika

Auch eine andere Frage stellt sich: Reagieren die Zellen ebenfalls auf die Behandlung mit anderen Zytostatika mit einer verstärkten DKK1-Sekretion? Um dies zu klären, wurden MTT-Platten der Zelllinien Cal27 und Cal27res angesetzt, denen Verdünnungsreihen von Oxaliplatin (anderes Platin-Derivat, was ein anderes DNA-Addukt als Cisplatin erzeugt), Paclitaxel (greift in die Zellteilung ein indem es den Abbau der Mikrotubuli inhibiert) und Methotrexat (MTX, ein Folsäureantagonist) zugesetzt wurden. Das Volumen des Überstandes wurde von 100 µl je Well auf 200 µl je Well verdoppelt, so dass nach 24stündiger Inkubation der Zellen mit den Zytostatika 100 µl des Überstandes jedes Wells eingefroren und die MTT-Platten normal weiter inkubiert werden konnten.

Folgende Proben wurden auf ihren DKK1-Gehalt im Nährmedium untersucht: Nährmedienüberstände von Zellen, die über 24 h mit 1 µM **Oxaliplatin** (nach 72 h zeigten sie eine gleich ausgeprägte Formazanbildung wie die unbehandelte Kontrolle), mit 10 µM Oxaliplatin (entsprach etwa der EC₅₀ beider Zelllinien) und mit 316 µM Oxaliplatin (nach 72 h waren alle Zellen tot und zeigten keine Formazanbildung mehr) behandelt worden sind. Der ermittelte Gehalt dieser Proben an DKK1 im Nährmedienüberstand ist in Abbildung 4.32 dargestellt.

Zumindest die Zelllinie Cal27res reagierte mit einem signifikanten Anstieg der DKK1-Sezernierung bei steigender Oxaliplatin-Konzentration. Für Cal27 ist unter 316 µM Oxaliplatin zwar ebenfalls ein Anstieg der DKK1-Level zu beobachten, der aber nicht signifikant ist. Vergleicht man auch hier die DKK1-Sezernierung zwischen Cal27 und Cal27res, zeigt sich ebenfalls, dass

Cal27 unbehandelt etwa doppelt so viel DKK1 sezerniert wie Cal27res, nämlich 279 ± 98 % der DKK1-Level von Cal27res.

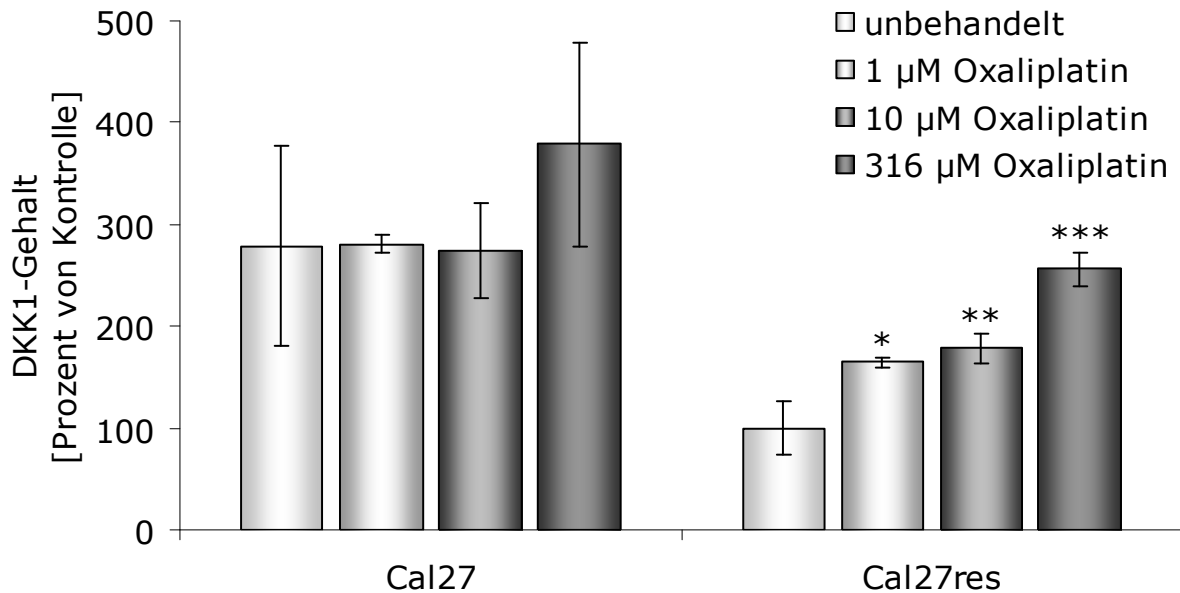


Abbildung 4.32: Reaktion von Cal27 und Cal27res in Bezug auf DKK1-Sezernierung nach 24 h Inkubation der Zellen mit verschiedenen Oxaliplatin-Konzentrationen. Der DKK1-Gehalt der unbehandelten Probe von Cal27res wurde als 100 % (= Kontrolle) gesetzt und die anderen Proben darauf bezogen. Die angegebenen Signifikanzniveaus wurden mittels t-Test ermittelt und beziehen sich auf die jeweilige unbehandelte Probe. MW \pm mittlere Abweichung der Mittelwerte aus jeweils zwei Replikaten. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$ (t-Test). Der DKK1-Gehalt wurde bezogen auf die SRB-Absorption der Zellproteine.

Unter **Paclitaxel**-Behandlung (siehe Abbildung 4.33) wurde der Einfluss von 31,6 nM Paclitaxel auf die DKK1-Sezernierung der Zelllinien Cal27 und Cal27res untersucht. Dies war die niedrigste für den MTT-Test eingesetzte Paclitaxel-Konzentration, bei der nach 72 h aber keine Formazanbildung mehr zu beobachten war, also alle Zellen tot waren. Die EC_{50} für Paclitaxel liegt also deutlich unter 31,6 nM. Beide Cal27-Zelllinien zeigen einen Anstieg des DKK1-Gehaltes, jedoch ist dieser weder bei Cal27 noch bei Cal27res signifikant. Erkennbar ist aber eine signifikant gesteigerte, etwa 2fache DKK1-Sezernierung der sensitiven Zelllinie im Vergleich zu Cal27res (100 ± 22 % zu 210 ± 61 %, $p = 0,0425$).

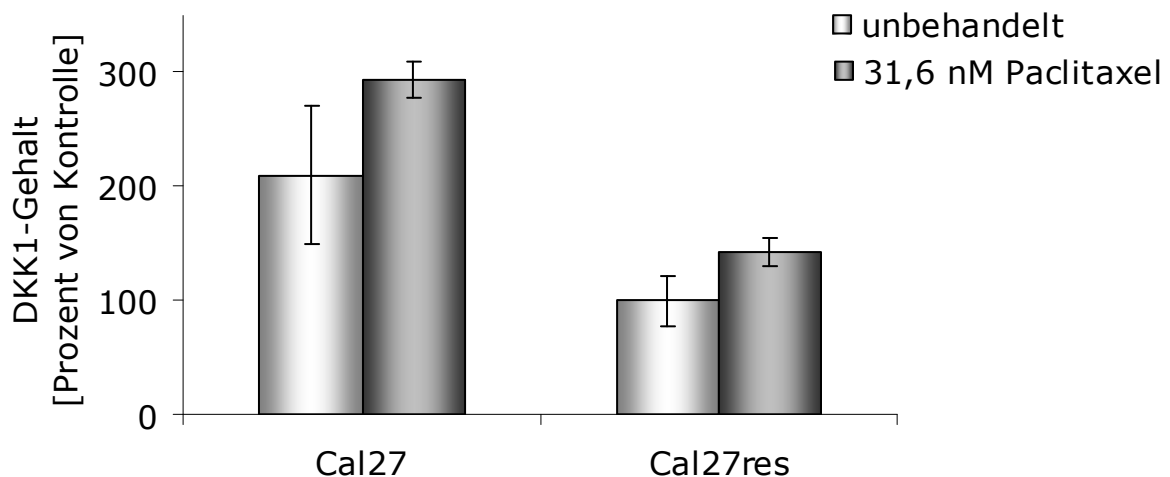


Abbildung 4.33: Einfluss von Paclitaxel auf die DKK1-Sezernierung bei Cal27 und Cal27res nach 24 h Behandlung mit 31,6 nM Paclitaxel. Der DKK1-Gehalt der unbehandelten Probe von Cal27res wurde als Kontrolle mit 100 % gleichgesetzt. MW \pm mittlere Abweichung der Mittelwerte aus jeweils zwei Replikaten. Der DKK1-Gehalt wurde bezogen auf die SRB-Absorption der Zellproteine.

Ein anderes Bild zeigt sich unter **Methotrexat** (MTX)-Behandlung (316 nM über 24 h). Ebenso wie bei Paxlitacel war bei den mit 316 nM behandelten Zellen nach 72 h keine Formazanbildung mehr zu beobachten.

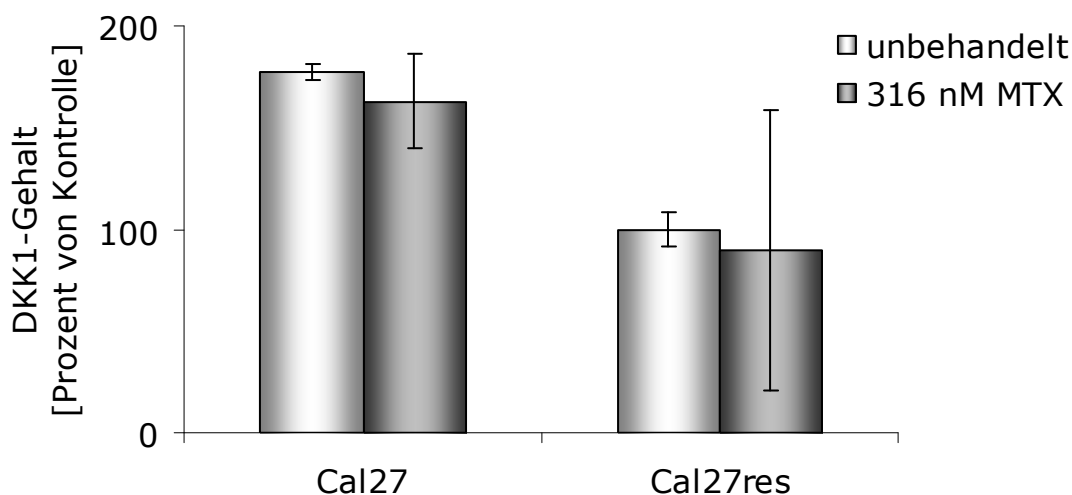


Abbildung 4.34: Einfluss von Methotrexat auf die DKK1-Sezernierung bei Cal27 und Cal27res nach 24 h Behandlung mit 31,6 nM Methotrexat. Der DKK1-Gehalt der unbehandelten Probe von Cal27res wurde als Kontrolle mit 100 % gleichgesetzt. MW \pm mittlere Abweichung der Mittelwerte aus jeweils zwei Replikaten. Der DKK1-Gehalt wurde bezogen auf die SRB-Absorption der Zellproteine.

Da 316 nM die niedrigste MTX-Konzentration war, mit denen die Zellen behandelt worden sind, wurden die entsprechenden Überstände mittels ELISA auf ihren DKK1-Gehalt untersucht (siehe Abbildung 4.34). Weder Cal27 noch Cal27res zeigen eine gesteigerte DKK1-Sezernierung.

Sowohl für MTX als auch für Paclitaxel waren die gewählten Konzentrationen zu hoch, um eine auswertbare Aussage zu treffen ob DKK1 durch diese Zytostatika verstärkt sezerniert wird. Da die Zytostatika-Konzentrationen einen Einfluss auf die DKK1-Sezernierung haben könnten, ist vor einer Wiederholung dieses Experimentes die genaue Bestimmung der pEC_{50} von Oxaliplatin, MTX und Paclitaxel für beide Zelllinien Cal27 und Cal27res sinnvoll. Es ist nicht auszuschließen, dass eine signifikant verstärkte DKK1-Sezernierung auch unter MTX- und Paclitaxel-Behandlung der Zellen auftreten würde, wenn niedrigere Konzentrationen dieser Zytostatika eingesetzt würden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unter verschiedenen Stresssituationen eine verstärkte DKK1-Sezernierung der Zellen Cal27 und Cal27res zu beobachten war. Dies war zum einen an Mangel an Nährstoffen, wie er auftritt, wenn das Nährmedium der Zellen verbraucht ist oder unter Serumentzug. Auch unter der Behandlung mit Cisplatin und Oxaliplatin konnten signifikant verstärkte DKK1-Sezernierungen beobachtet werden. Nicht signifikant, aber ebenfalls eine erhöhte DKK1-Konzentration war im Nährmedium von Paclitaxel-behandelten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen zu beobachten. Diese Zellen waren ebenso wie die mit MTX behandelten Zellen zu hohen Konzentrationen (deutlich größer als EC_{50}) der Zytostatika ausgesetzt, so dass keine endgültige Aussage über den Einfluss dieser Zytostatika auf die DKK1-Sezernierung getroffen werden kann.

4.4.4 Pharmakologische Beeinflussung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges

GSK3-Inhibitoren

Um weitere Informationen zu erhalten, welchen Einfluss der Wnt-Antagonist DKK1 und damit der Wnt/ β -Catenin-Signalweg auf das Phänomen der Cisplatin-Resistenz haben, wurde der Einfluss von GSK3-Inhibitoren auf die Cisplatin-Resistenz der Zelllinie Cal27res untersucht. GSK3 β ist eine zentrale Kinase im Wnt/ β -Catenin-Signalweg, die β -Catenin phosphoryliert und damit für den Abbau markiert. Eine detaillierte Erläuterung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges ist in Kapitel 5.3 zu finden. Die Inhibierung von GSK3 β entspricht der Aktivierung des Wnt/ β -Catenin-Signalweges, also einem entgegengesetzten Effekt zu DKK1.

Jedoch hatten weder der Zusatz von BIO noch von 1-Azakenpaullon einen Einfluss auf das Ergebnis der MTT-Tests, die mit der Zelllinie Cal27res durchgeführt worden sind (Tabelle 4.10). Mittels der Analyse nach Tukey ergab sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich aller Versuchsansätze untereinander.

Tabelle 4.10: Ermittelte pEC_{50} -Werte der MTT-Tests mit Cisplatin an Cal27res unter Zusatz verschiedener Konzentrationen von BIO und 1-Azakenpaullon, MW \pm SE aus n = 1 mit je 3 Replikaten.

GSK-Inhibitor	finale Konzentration	$pEC_{50} \pm SE$
Kontrolle	-	$4,74 \pm 0,07$
BIO	50 nM	$4,90 \pm 0,13$
	200 nM	$4,79 \pm 0,15$
	1 000 nM	$4,57 \pm 0,13$
1-Azakenpaullon	200 nM	$4,57 \pm 0,08$
	500 nM	$4,69 \pm 0,06$
	1 000 nM	$4,69 \pm 0,09$
	2 000 nM	$4,80 \pm 0,07$

Keiner der beiden eingesetzten GSK3-Inhibitoren (BIO und 1-Azakenpaullon) rief damit eine detektierbare Veränderung der Sensitivität der Zelllinie Cal27res hervor. Dies kann verschiedene Ursachen haben. Das Testsystem des MTT-Tests könnte ungeeignet sein, die Auswirkungen der GSK3-Inhibitoren auf die Sensitivität der Zellen zu erfassen, da die Inkubation mit Cisplatin in Kombination mit den Inhibitoren über 72 h erfolgt. Es existieren keine Untersuchungen, wie lange die Inhibitoren im Nährmedium stabil sind und die Zellen beeinflussen können.

Es wurden zwar in Anlehnung an die Herstellerangaben sehr hohe Konzentrationen der Inhibitoren eingesetzt, jedoch geben die Hersteller keine Informationen, wie die angegebenen IC_{50} -Werte bestimmt worden sind. Wenn diese am isolierten Enzym gemessen worden sind, kann es sein, dass die Konzentrationen, mit denen man in der Zellkultur die Zellen kultiviert, deutlich größer sein müssen, um entsprechende Hemmkonzentrationen an den Enzymen im Zellinnern zu erreichen.

Als weitere Ursache wäre denkbar, dass beide Inhibitoren entweder zu unspezifisch sind bzw. GSK3 β noch in weiteren Signalwegen als dem Wnt/ β -Catenin-Signalweg zentrale Rollen einnimmt. BIO ist deklariert als Inhibitor sowohl der GSK3 α als auch der GSK3 β . Daher muss eine Behandlung der Zellen mit BIO bzw. 1-Azakenpaullon nicht zu einer Veränderung der Sensitivität führen.

Inwieweit diese mit der resistenten Zelllinie Cal27res erhaltenen Ergebnisse auch auf die sensitive Zelllinie Cal27 zutreffen, wäre in weiteren Versuchen zu untersuchen. Denkbar ist, dass beide Inhibitoren eher in der sensitiven Zelllinie die vermutete Resistenzentwicklung hervorrufen. Die sensitive Zelllinie ist die DKK1-überexprimierende. Bei Anwesenheit von DKK1 ist GSK3 β aktiv und eine Inhibierung dieses Enzyms könnte zu stärker ausgeprägten Effekten führen als bei der resistenten Zelllinie Cal27res.

MTT-Test unter Zusatz von DKK1 und Antikörper

Eine weitere Möglichkeit, Informationen über den Einfluss von DKK1 auf das Phänomen der Cisplatin-Resistenz zu erhalten, ist, DKK1 bzw. den DKK1-Antikörper (DKK1-AK) dem Nährmedium während des Zytotoxizitäts-Tests zuzusetzen. Zusätzlich zugesetztes DKK1 könnte zu einer verstärkten DKK1-Wirkung führen. Der Antikörper hingegen soll sezerniertes DKK1 im Nährmedium neutralisieren und dadurch die DKK1-Wirkung mindern. Daher wurden MTT-Tests mit den Zelllinien Cal27 und Cal27res unter Zusatz von DKK1 bzw. DKK1-AK zusätzlich zu der Cisplatin-Verdünnungsreihe durchgeführt. Aber weder der Zusatz des Proteins DKK1 in einer Konzentration von 20 ng/ml noch der Zusatz von DKK1-Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/ml haben Einfluss auf die mittels MTT-Test ermittelte Cisplatin-Sensitivität, ebenso wenig wie zuvor der Zusatz der GSK3-Inhibitoren BIO und 1-Azakenpaullon. Die durch nicht-lineare Anpassung ermittelten Konzentrations-Effekt-Kurven je Zelllinie sind praktisch deckungsgleich und die EC_{50} -Werte nicht signifikant verschieden (Abbildung 4.35).

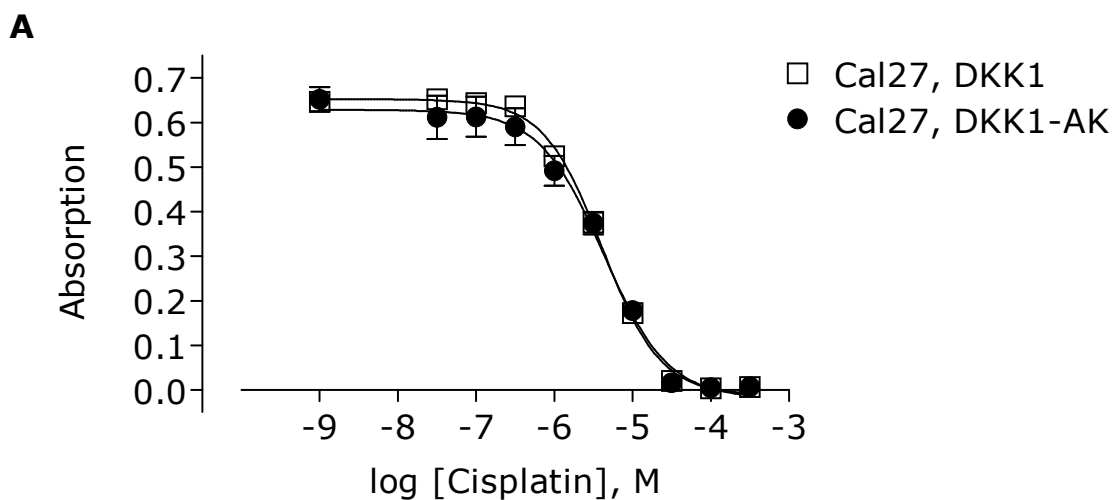


Abbildung 4.35 A. Legende siehe nächste Seite.

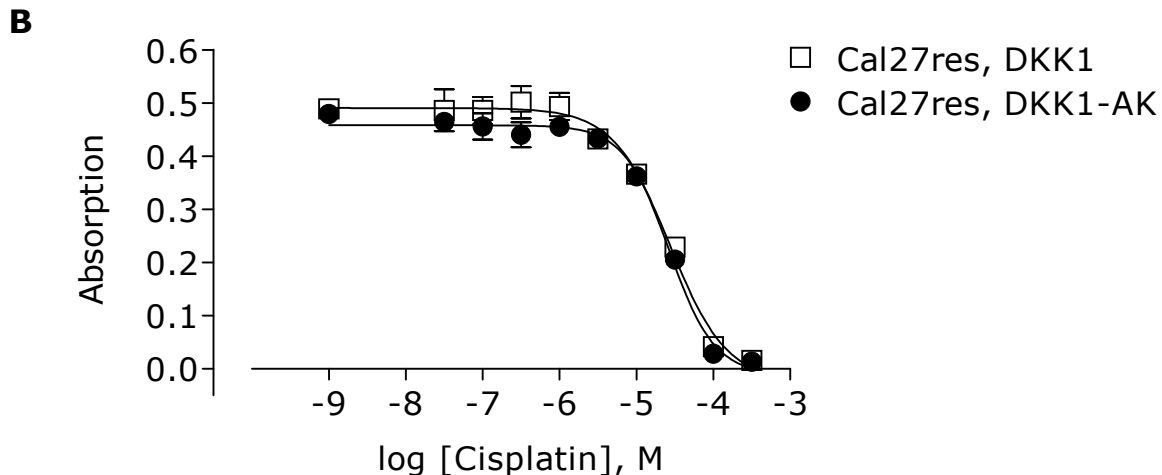


Abbildung 4.35: Beeinflussung der Cisplatin-Sensitivität durch Zusatz von 20 ng/ml DKK1-Protein (DKK1) bzw. 1 µg/ml DKK1-Antikörper (DKK1-AK) zum Nährmedium des MTT-Tests von Cal27-Zellen (A) bzw. Cal27res-Zellen (B), MW ± SE aus n = 1 mit 3 Replikaten.

Auch hier ist nicht bekannt, wie lange DKK1 und der DKK1-Antikörper im Nährmedium stabil sind. Die Konzentration des Antikörpers wurde in dem Bereich gewählt, in dem sie auch im DKK1-ELISA eingesetzt wurde. Damit müsste sie auf jeden Fall ausreichend sein, um das sezernierte DKK1 zu binden. An welche Regionen des DKK1 der Antikörper bindet ist nicht bekannt. Es ist zwar unwahrscheinlich, aber eventuell ist an den Antikörper gebundenes DKK1 weiterhin in der Lage, an Kremen 2 und LRP 5 zu binden, so dass der Zusatz des Antikörpers zum Nährmedium keine Auswirkung auf die Wirkung von DKK1 hat. Auch der Zusatz des rekombinanten Proteins führte nicht zu einer Sensitivierung der Zellen. Hier besteht die Möglichkeit, dass das rekombinante Protein nicht aktiv ist und nicht die Effekte von natürlichem DKK1 an den Rezeptoren vermitteln kann. Ebenso ist offen, wie lange es im Nährmedium bei einer Kultivierung der Zellen bei 37 °C stabil ist. Gregory et al. führten Zellkulturversuche unter Zusatz von rekombinantem DKK1 (100 ng/ml und 10 ng/ml) durch, um den Einfluss von DKK1 auf die Zellproliferation zu untersuchen.¹¹⁵ Bei 10 ng/ml konnten sie eine proliferationsfördernde Wirkung von DKK1 über 15 h beobachten, bei 100 ng/ml über 30 h. Das spricht dafür, dass der MTT-Test, der über 72 h geht, bei einem Einsatz von 20 ng DKK1 pro 1 ml Nährmedium nicht geeignet ist, Effekte von DKK1 zu verfolgen. Eine Wiederholung dieses Experimentes mit höheren DKK1-Konzentrationen und einer kürzeren Inkubationszeit des MTT-Tests oder der Einsatz eines anderen Testsystems wie des ATP-Tests wären zu überlegen.

4.5 DKK1-Überexpressionsklone

4.5.1 Sequenzierung der Plasmide

Unter Zusatz der GSK3 β -Inhibitoren bzw. von DKK1 und des Antikörpers war keine Beeinflussung der Cisplatin-Sensitivität der Zellen zu beobachten. Aber diese Versuchsergebnisse sind zu erklären. Auch wenn es auf den ersten Blick nicht so aussieht und dennoch kann DKK1 im Zusammenhang mit der Cisplatin-Sensitivität stehen. Um dies zu klären, wurden DKK1-überexprimierende Zelllinien etabliert. Dafür musste ein Plasmid konstruiert werden (siehe Kapitel 3.12), dass die Expression von DKK1 in Säugetierzellen ermöglicht. Nach der Klonierung der Sequenz von DKK1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) wurden die Plasmide pcDNA3.1/DKK1_{Kozak} und pcDNA3.1_{nonKozak} erhalten. pcDNA3.1/DKK1_{Kozak} entsprach der Kozak-Konsensussequenz, pcDNA3.1/DKK1_{nonKozak} nicht (vergleiche Kapitel 3.12.3). Die Sequenzierung dieser Plasmide bestätigte deren korrekte Sequenz, so dass sie mittels Calciumphosphat-Transfektion (siehe Kapitel 3.13) in die nativen Cal27- und Cal27res-Zellen transfiziert werden konnten. Als Kontrollen wurden beide Zelllinien ebenfalls mit dem pcDNA3.1-Leervektor transfiziert.

4.5.2 PCR-Selektion

Nach der Geneticin-Selektion der transfizierten Zelllinien und dem Heranziehen einzelner Klone war es mittels PCR möglich, zwischen Klonen zu unterscheiden, die das Plasmid aufgenommen hatten und denen, in denen die Sequenzen nicht nachzuweisen waren. Dazu wurden Zellen der Klone in TE-Puffer pH 7,5 lysiert. Dieses Lysat diente als Template für die PCR (siehe Kapitel 3.13.4). In Tabelle 4.11 sind beispielhaft PCR-Ergebnisse verschiedener Klone dargestellt.

Tabelle 4.11: Beispielhafte PCR-Ergebnisse (C_T -Werte) von Überexpressionsklonen der Zelllinie Cal27. Um zu überprüfen, ob die Cal27-Klone den Leervektor aufgenommen hatten, wurde eine PCR der Zelllysate mittels T7/BGH-Primern durchgeführt. Die Zelllysate der DKK1-Überexpressionsklone wurden mit Hilfe der Exon-Exon-Primer von DKK1 amplifiziert. Als Kontrolle wurde eine PCR mit Primern (E61) durchgeführt, die genomische DNA amplifizieren.

Leervektor			Kozak-Sequenz		
Klon	E61	T7/BGH	Klon	E61	DKK1
1	22,6	33,7	1	21,5	23,8
2	25,7	27,6	2	23,4	-
3	23,9	35,1	3	21,2	24,0
4	26,2	28,7	4	25,3	-
5	25,7	33,9	5	23,6	-

Vergleicht man die C_T -Werte der **Leervektor-Klone**, erkennt man, dass die Signale für T7/BGH in Klon 2 und Klon 4 1,9 bzw. 2,5 Zyklen nach den Signalen für E61 (Kontrolle der PCR mit Primern gegen genomische DNA) kamen. Die Differenz der C_T -Werte der anderen Klone war mit mehr als acht Zyklen deutlich größer.

Die Ergebnisse für die **DKK1_{Kozak}-Klone** sind noch eindeutiger, da einige Klone mit DKK1-Primern keine Signale ($C_T > 40,0$) in der PCR zeigten. Klon 1 und Klon 3 dagegen zeigten DKK1- C_T -Werte, die 2,3 bzw. 2,8 Zyklen nach den E61- C_T -Werten kamen. Die DKK1_{nonKozak}-Klone wurden im Folgenden nicht weiter untersucht.

So konnten jeweils ein Leervektor-Klon und ein DKK1_{Kozak}-Klon sowohl von der sensitiven Zelllinie Cal27 als auch von der resistenten Zelllinie Cal2res ausgewählt werden. Diese werden in dieser Arbeit als **Cal27-Leer**, **Cal27res-Leer**, **Cal27-DKK1** und **Cal27res-DKK1** bezeichnet.

4.5.3 DKK1-Expression von Cal27-DKK1 und Cal27res-DKK1

Die beiden untersuchten DKK1-Überexpressionsklone Cal27-DKK1 und Cal27res-DKK1 zeigten beide im Vergleich zu ihrer nichttransfizierten parentalen Zelllinie eine deutlich gesteigerte DKK1-Expression. In diesem Versuch wurden die Überexpressionsklone mit ihren parentalen Zelllinien verglichen. In Abbildung 4.36 ist das Ergebnis eines Versuches abgebildet, in dem die Zellen 36 h in 96-Well-Platten inkubiert wurden. Das Nährmedium wurde auf den DKK1-Gehalt analysiert, der wiederum auf den SRB-Protein-Gehalt standardisiert wurde.

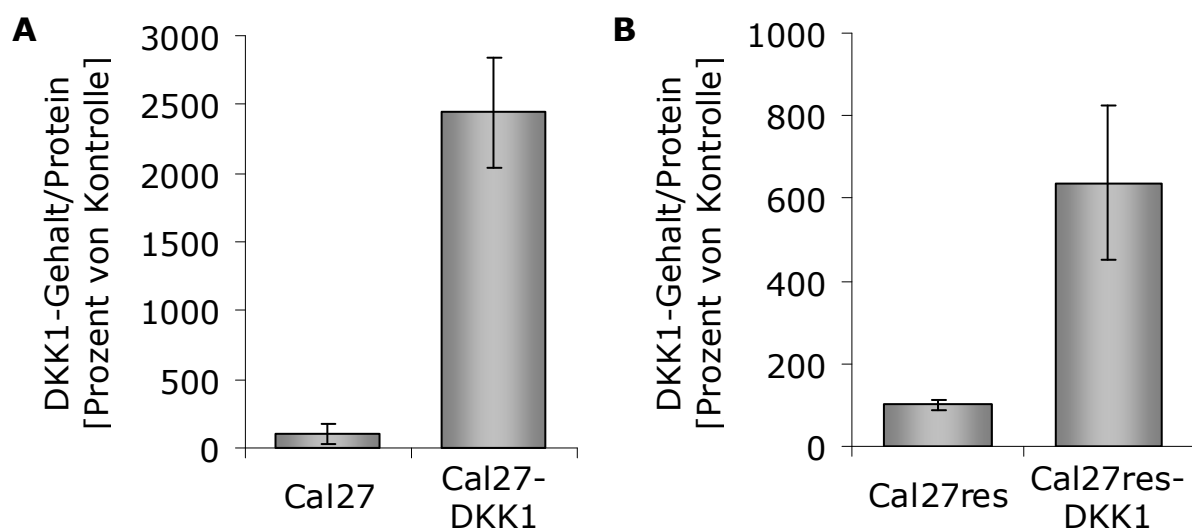


Abbildung 4.36: DKK1-Expression der Überexpressionsklone Cal27-DKK1 (A) und Cal27res-DKK1 (B) im Vergleich zu der jeweiligen nichttransfizierten Zelllinie (Kontrolle) nach 36stündiger Kultivierung der Zellen und Normalisierung des DKK1-Gehalts im Nährmedium auf den SRB-Proteingehalt der Zellen. MW \pm SD aus je drei Replikaten.

Dabei zeigt der Klon Cal27-DKK1 im Vergleich zu seiner parentalen Zelllinie Cal27 eine etwa 240fach gesteigerte DKK1-Sezernierung ins Nährmedium, der Klon Cal27res-DKK1 im Vergleich zu seiner parentalen Zelllinie Cal27res eine 64fach gesteigerte DKK1-Sezernierung. Dabei ist zu beachten, dass die resistenten Zellen deutlich größer sind und daher höhere Signale im SRB-Test ergeben, so dass sich der DKK1-Gehalt bezogen auf die Zellzahl angleichen würde. Auf jeden Fall zeigen beide Überexpressionsklone eine deutlich gesteigerte DKK1-Sezernierung im Vergleich mit ihrer jeweils parentalen Zelllinie.

4.5.4 Cisplatin-Sensitivität der DKK1-Klone: MTT-Test

Die Untersuchung der Klone mittels MTT-Test zeigt für Cal27-Leer eine pEC_{50} von $5,23 \pm 0,03$ und für Cal27-DKK1 von $5,63 \pm 0,03$. Daraus ergibt sich, dass Cal27-DKK1 2,5fach sensitiver ($p < 0,001$) gegenüber Cisplatin ist als Cal27-Leer. Die entsprechenden Kurven sind in Abbildung 4.37 A dargestellt.

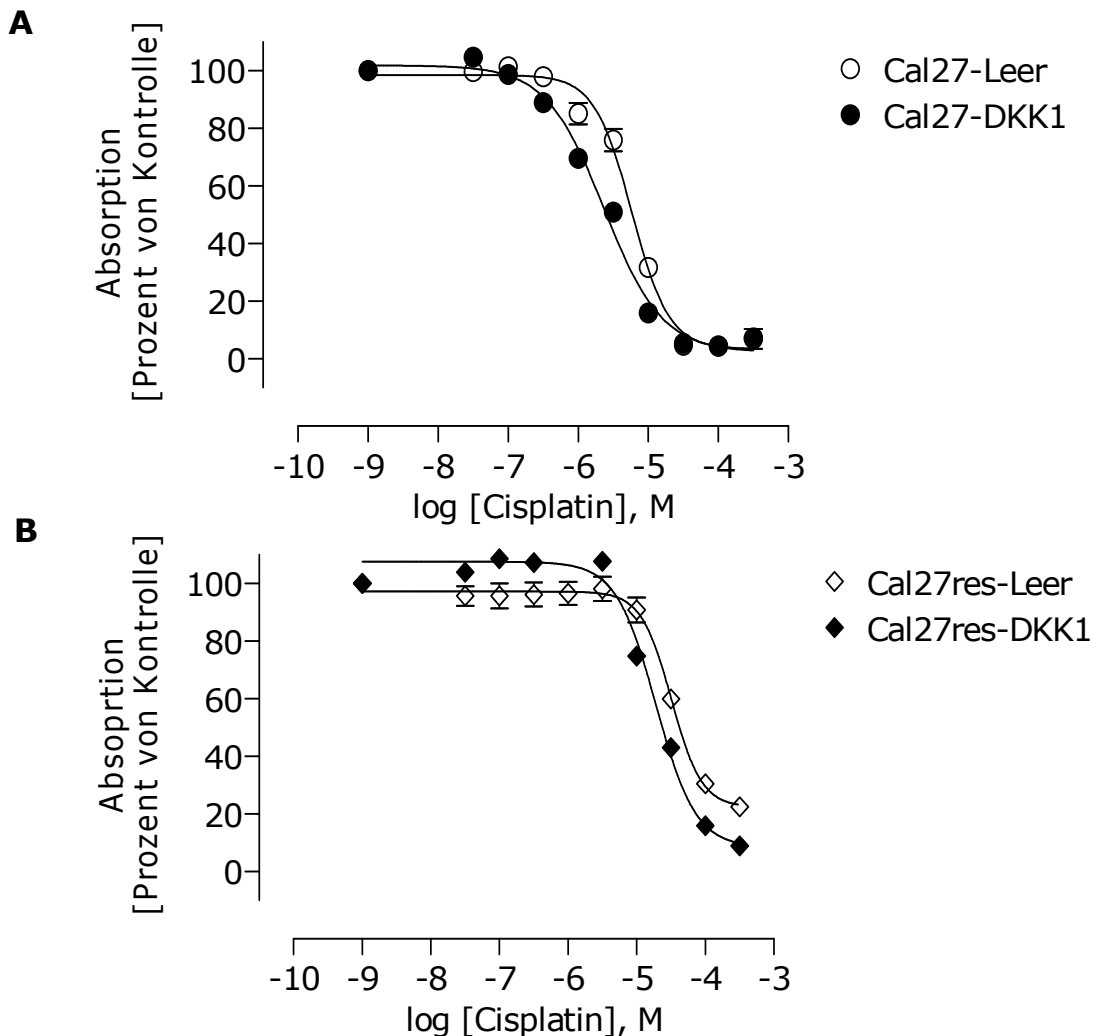


Abbildung 4.37: Ergebnisse der MTT-Versuche der Klone Cal27-Leer und Cal27-DKK1 (A) bzw. Cal27res-Leer und Cal27res-DKK1 (B), $MW \pm SE$, $n = 3$ bei Cal27-Leer / Cal27res-Leer bzw. $n = 5$ bei Cal27-DKK1 / Cal27res-DKK1 mit je 3 Replikaten. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der jeweiligen Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

Für den resistenten DKK1-überexprimierenden Klon Cal27res-DKK1 ergibt sich eine 1,7fache Sensitivierung ($p = 0,0034$) gegenüber seinem Kontrollklon Cal27res-Leer. Die Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung

4.37 B dargestellt, aus denen sich pEC_{50} -Werte für Cal27res-Leer von $4,49 \pm 0,05$ und für Cal27res-DKK1 von $4,72 \pm 0,04$ ableiten.

4.5.5 Cisplatin-Sensitivität der DKK1-Klone: BrdU-Test

Diese Sensitivierung der DKK1-Überexpressionsklone gegenüber Cisplatin ist auch im BrdU-Test zu sehen: Für Cal27-Leer ergibt sich ein pEC_{50} -Wert von $5,80 \pm 0,05$. Der DKK1-Überexpressionsklon Cal27-DKK1 ist mit einem $pEC_{50} = 6,13 \pm 0,04$ 2,1fach sensitiver ($p < 0,001$, Abbildung 4.38 A).

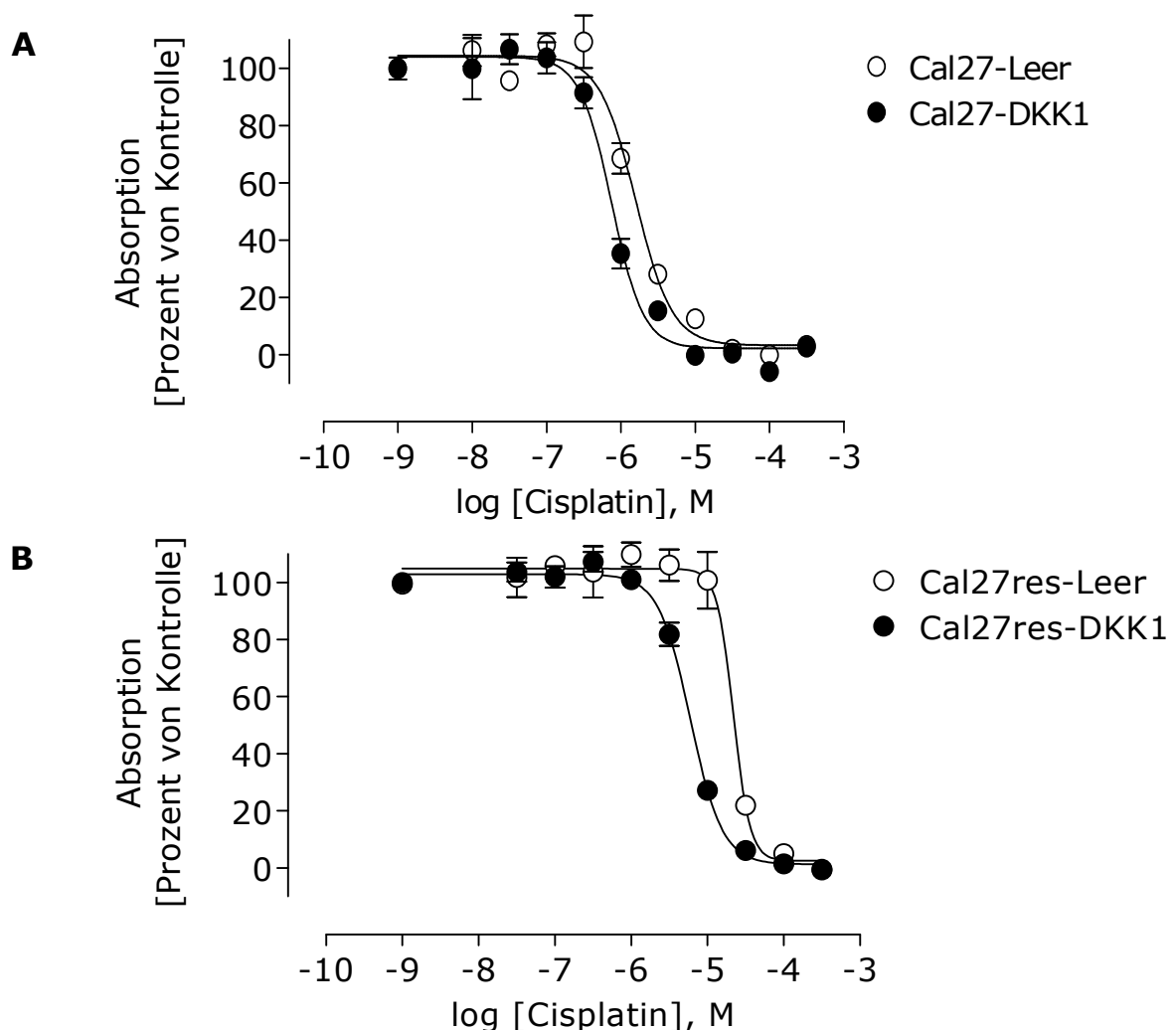


Abbildung 4.38: Ergebnisse der BrdU-Versuche der Klone Cal27-Leer und Cal27-DKK1 (A) bzw. Cal27res-Leer und Cal27res-DKK1 (B), MW \pm SE, n = 3 mit je 3 Replikaten bei Cal27-Leer / Cal27res-Leer bzw. n = 5 mit je 3 Replikaten bei Cal27-DKK1 / Cal27res-DKK1. Daten normalisiert auf MW der Absorption der jeweiligen Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

Für die Klone der resistenten Zelllinie ergibt sich ein ähnliches Bild, die entsprechenden Konzentrations-Effekt-Kurven sind in Abbildung 4.38 B dargestellt. Der mit dem Leervektor transfizierte Klon Cal27res-Leer zeigt einen pEC_{50} -Wert von $4,66 \pm 0,05$, und der DKK1-überexprimierende Klon Cal27res-DKK1 einen pEC_{50} -Wert von $5,22 \pm 0,02$. Dies entspricht einer signifikanten Sensitivierung ($p < 0,001$) um den Faktor 3,7 durch die DKK1-Überexpression.

4.5.6 Vergleich der MTT- und BrdU-Daten der Klone

In Tabelle 4.12 sind die ermittelten pEC_{50} -Werte für die MTT- und BrdU-Test der transfizierten Cal27-Zelllinien aus den Abbildungen 4.37 und 4.38 gegenübergestellt.

Tabelle 4.12: Vergleich der MTT- und BrdU-Daten der verschiedenen transfizierten Cal27-Zelllinien.

Zelllinie	MTT $pEC_{50} \pm SE$	BrdU $pEC_{50} \pm SE$
Cal27-Leer	$5,23 \pm 0,03$	$5,80 \pm 0,05$
Cal27-DKK1	$5,63 \pm 0,03$	$6,13 \pm 0,04$
<i>Resistenzfaktor</i>	2,5	2,1
Cal27res-Leer	$4,49 \pm 0,05$	$4,66 \pm 0,05$
Cal27res-DKK1	$4,72 \pm 0,04$	$5,22 \pm 0,02$
<i>Resistenzfaktor</i>	1,7	3,7

Bei einem Vergleich der Konzentrations-Effekt-Kurven des MTT- mit den BrdU-Tests eines jeden Klones ist jeweils die Kurve des BrdU-Tests signifikant (Cal27res-Leer $p < 0,005$, alle anderen $p < 0,0001$) linksverschoben (siehe Tabelle 4.12). Dies ist dadurch zu erklären, dass Zellen, die noch lebensfähig, aber im Zyklusarrest sind, zwar ein Signal im MTT-Test zeigen, jedoch nicht im BrdU-Test.

5 Diskussion

5.1 Etablierung der Cisplatin-resistenten Subzelllinie Cal27res und ihr Vergleich zu Cal27

Durch die passagenweise Kultivierung der Zelllinie Cal27 mit Cisplatin war es möglich, die Zelllinie Cal27res mit einem für Cisplatin hohen Resistenzfaktor von etwa 10 zu etablieren. Verglichen mit dem ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zellpärchen A2780/A2780cis, das einen Resistenzfaktor von etwa 5 aufwies, ist der Resistenzfaktor des Zellpärchens Cal27/ Cal27res mit etwa 10 deutlich größer. Die Resistenzfaktoren beider Zellpärchen liegen im üblichen Bereich, *in vitro* erreichbare Resistenzfaktoren liegen selten höher als 10. Tabelle 5.1 gibt einen Überblick über einige publizierte Cisplatin-sensitiv/resistente Zellpärchen und deren ermittelte bzw. publizierte Resistenzfaktoren.

Tabelle 5.1: Überblick über die Resistenzfaktoren publizierter Cisplatin-sensitiv/resistenter Zellpärchen.

sensitive Zelllinie	Gewebe	resistente Zelllinie	Resistenzfaktor	Referenz
A2780	humanes Ovarial-CA	A2780cis	5,0	diese Arbeit
RT112	humanes Blasen-CA	resistente RT112	4	Walker et al. ¹¹⁶
SuSa	humanes Hoden-CA	resistente SuSa	4	Walker et al. ¹¹⁶
IGROV-1	humanes Ovarial-CA	IGROV-1/Pt0.5	10	Perego et al. ¹¹⁷
IGROV-1	humanes Ovarial-CA	IGROV-1/Pt1	14	Perego et al. ¹¹⁷
OCUM-2M	humanes Magen-CA	OCUM-2M/DDP	11,3	Nitta et al. ¹¹⁸
Tca8113	humanes, orales squam.-zelliges CA	Tca/cisplatin	6,5	Zhang et al. ¹¹⁹
T24	humanes Blasen-CA	T24R1	4,7	Hong et al. ¹²⁰
T24	humanes Blasen-CA	T24R2	7,5	Hong et al. ¹²⁰
A431	hum. Epidermis-CA	A431-CDDP1	3,1	Mese et al. ¹²¹
A431	hum. Epidermis-CA	A431-CDDP2	2,7	Mese et al. ¹²¹
SBC-3	hum. kleinzelliges Lungen-CA	SBC-3/CDDP	13,1	Moritaka et al. ¹²²

Die etablierte Cisplatin-resistente Zelllinie Cal27res war daher eine gute Basis, die Mechanismen der Cisplatin-Resistenz näher zu untersuchen. Der große Vorteil dieser selbst etablierten Zelllinie lag darin, dass sie zeitnah zu der durchgeführten suppressiven Subtraktionshybridisierung (SSH) gene-

riert worden ist und damit die Gefahr verringert werden konnte, dass sich die Zelllinie während der Zellkultur über viele Passagen kontinuierlich veränderte.

Die Beobachtung, dass die resistente Zelllinie Cal27res nicht signifikant weniger Cisplatin aufnimmt als die sensitive Cal27 (siehe Abbildung 4.9), passt zu den Ergebnissen von C. Stratenschulte.¹²³ Stratenschulte untersuchte im Rahmen einer Diplomarbeit die Genexpression der Kupfertransporter CTR1, CTR2, ATP7A und ATP7B. Dabei konnte sie keine signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Cal27res und Cal27 sowohl im unbehandelten Zustand als auch als Reaktion der Zellen auf eine Behandlung mit Cisplatin detektieren. Die größten Expressionsunterschiede beobachtete sie bei ATP7A (Kupfer-Efflux), das sowohl unbehandelt (Faktor $2,70 \pm 1,41$) als auch auf Cisplatin-Behandlung ($2,92 \pm 1,97$) fast 3fach in Cal27res im Vergleich zu Cal27 überexprimiert war. Jedoch ergab sich aufgrund der großen Standardfehler keine Signifikanz dieser Daten.

Zum Vergleich der Genexpression dieser beiden Zelllinien wurde eine Subtraktionshybridisierung (SSH) durchgeführt. Diese Technik ist heute neben Mikroarrays durchaus noch aktuell.¹²⁴ Mit ihr ließen sich die fünf im Folgenden vorgestellten Kandidatengene (AKR1B1, CSTA, DKK1, RPL5 und THBS1) identifizieren, die sich bis auf RPL5 als differentiell zwischen Cal27 und Cal27res exprimiert zeigten (Bestätigung mittels qRT-PCR). Ob die differentielle Expression dieser Gene Teil einer generellen Reaktion der Zellen auf die Cisplatin-Behandlung ist, und ob und welche Rolle diese Gene im Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz spielen, sollte durch weitere Versuche untersucht werden. Dazu wurde die Änderung ihrer Expression und der Expression von weiteren interessanten Genen auf Cisplatin-Behandlung an 18 Tumorzelllinien untersucht.

Zwei Jahre nach der SSH standen auch Ergebnisse eines am *Center of advanced european studies and research* (CAESAR), Bonn, durchgeführten Mikroarrays zur Verfügung. Diese gaben ebenfalls keinen Hinweis auf eine differentielle Expression der Kupfertransporter zwischen beiden Zelllinien. Die differentielle Expression der mittels SSH identifizierten Kandidatengene konnte bis auf RPL5 auch mittels Mikroarray bestätigt werden (siehe Tabelle 4.4).

5.2 Expression der Kandidatengene in Tumorzelllinien

5.2.1 Aldo-Keto-Reduktasen

Das erste hier vorgestellte Kandidatengen ist **AKR1B1**, ein Mitglied der Aldo-Keto-Reduktasen. Es wurde in der SSH als in der resistenten Zelllinie Cal27res überexprimiert detektiert. Dies konnte auch mittels qRT-PCR (Faktor 2,3) und im Mikroarray (Faktor 2,4) bestätigt werden.

Die Aldo-Keto-Reduktasen (AKRs) sind eine von drei Superfamilien, die Redoxreaktionen katalysieren. Die 114 Proteine der AKRs besitzen Aminosäureketten, die zu mindestens 40 % die gleiche Sequenz aufweisen. Diese Proteine lassen sich 14 Familien (AKR1 bis AKR14) zuordnen, deren jeweiliges Merkmal eine zu mindestens 60 % identische Aminosäuresequenz ist. Die Mehrzahl der AKRs sind monomere, etwa 320 Aminosäuren lange Proteine, die NADPH/NADP⁺-abhängig als Aldehydreduktasen (AKR1A), Aldosereduktasen (AKR1B), Hydroxysteroid-/Dihydrodiol-Dehydrogenasen (AKR1C), Xylosereduktasen (AKR2B) u. a. agieren. AKR1B1 ist im Glukose-Metabolismus (Polyol-Signalweg) und an der Osmoregulierung beteiligt. Es scheint protektiv gegen toxische Aldehyde aus der Lipidperoxidation und der Steroidgenese zu wirken. Diese können das Zellwachstum und die Differenzierung beeinträchtigen, wenn sie akkumulieren.¹²⁵ Für die beiden AKR1C-Isoformen AKR1C1 und AKR1C2 wurde durch Penning nachgewiesen, dass sie durch ihre Dehydrogenase-Aktivität steuern, wie viel aktive Androgene, Östrogene und Gestagene zur Verfügung stehen, um an nukleären Rezeptoren zu binden. AKR1C-Isoformen sind am Metabolismus zweier Klassen von Tabak-Karzinogenen involviert: Nitrosaminketone aus Nikotin¹²⁶ und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe¹²⁷.

Lefrancois-Martinez et al. haben bewiesen, dass AKR1B1 in Nebennierenkarzinomen signifikant geringer als in Nebennierenadenomen exprimiert wird. Daher vermuten sie eventuell einen Zusammenhang mit der Tumorgenese von Nebennierentumoren und sehen in AKR1B1 einen Marker, der Aussagen über die Malignität der Tumore zulässt.¹²⁵ Auch mit anderen Tumoren ist AKR1B1 in Zusammenhang gebracht worden. Chen et al. fanden heraus, dass eine Prostatakarzinomzelllinie die Expression von

AKR1B1 herunterreguliert, wenn diese mit dem proliferationshemmenden Finasterid behandelt wird.¹²⁸ Ramana et al. konnten zeigen, dass AKR1B1 in Apoptose-Signalwege eingreift und eventuell ein obligates Enzym ist, das der Protein-Kinase C (PKC) vorgeschaltet ist.¹²⁹ Dan et al. untersuchten die Expression von 9 216 Genen in 39 humanen Krebszelllinien und fanden für die Expression von AKR1B1 und CTSB (Cathepsin B) eine Korrelation mit der Sensitivität bzw. Resistenz der Zellen zu verschiedenen Arzneistoffen. Für Cisplatin ermittelten sie eine positive Korrelation zwischen der Expression von AKR1B1 und der Chemosensitivität der Zellen, d. h. je höher die AKR1B1-Expression war, desto sensibler waren die Zellen gegen Cisplatin.¹³⁰ Eine Korrelation der Genexpression von AKR1B1 mit der Chemosensitivität der 18 in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien war bei der Auswertung nach NormIt nicht zu beobachten. Die 18 in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien stammten aus 14 verschiedenen Geweben. Dan et al. dagegen untersuchten 39 Zelllinien, die aus 9 verschiedenen Geweben hervorgegangen waren. Davon waren 18 Zelllinien Magenkarzinom-Zelllinien. Auch ihre Proben waren heterogen, jedoch nicht so heterogen wie die in dieser Arbeit untersuchten Proben.

In der SSH (Cal27 und Cal27res mit 10 μ M Cisplatin für 24 h behandelt) wurde AKR1B1 als überexprimiert in der resistenten Zelllinie identifiziert. Dies ließ sich durch die qRT-PCR der gleichen mRNA-Proben bestätigen (siehe Abbildung 4.13). Bei der Genexpressionsstudie mit 18 Zelllinien (Cal27 mit 4 μ M Cisplatin und Cal27res mit 40 μ M Cisplatin über 24 h behandelt, 48 h Auswaschphase) zeigte sich nach der Auswertung mit geNorm (siehe Abbildung 4.23 A) ebenfalls eine etwa 2fache Überexpression von AKR1B1 in Cal27res im Vergleich zu Cal27 nach der Cisplatin-Behandlung. Im Basalzustand (ohne Cisplatin-Behandlung) exprimierte Cal27res 6,6fach mehr AKR1B1 als Cal27. Nach der Auswertung nach NormIt (siehe Abbildung 4.23 B) verschob sich dieses Bild aufgrund der Normalisierung der C_T -Werte, und es zeigte sich nach Behandlung eine Überexpression von AKR1B1 in Cal27. Diese Ergebnisse der Abbildungen 4.13 und 4.23 sind in Abbildung 5.1 zusammengefaßt. Welche Auswertungsmethode jedoch realistischere Expressionsdaten hervorbringt, muss offen bleiben.

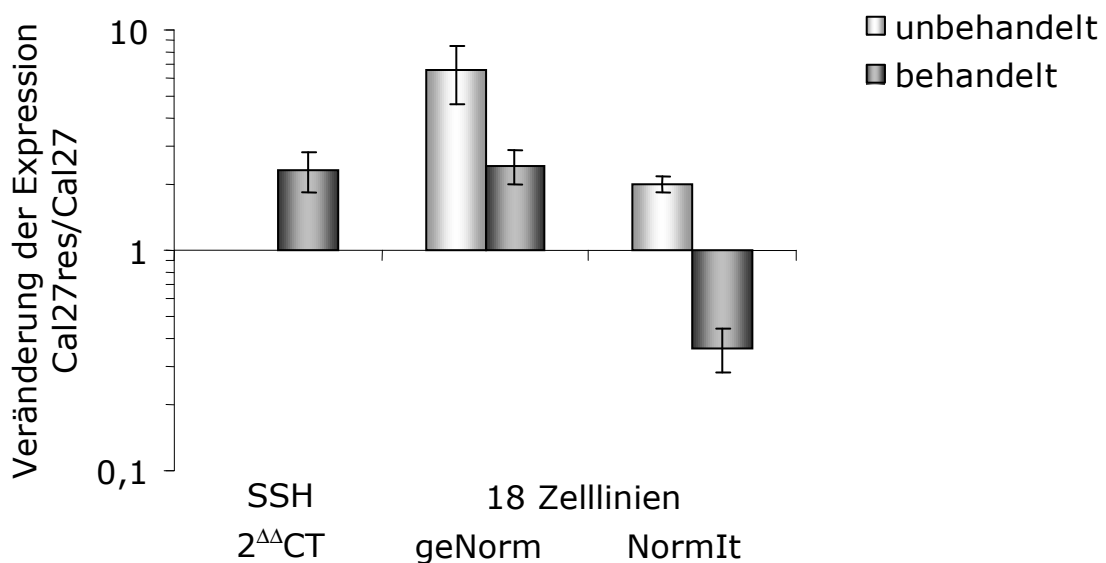


Abbildung 5.1: Vergleich der Expression von AKR1B1, ermittelt in der qRT-PCR-Bestätigung der SSH-Kandidatengene (ausgewertet mit der $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode) mit den nach geNorm und NormIt ausgewerteten Experimenten der 18-Zelllinien-Genexpressionsstudie. MW \pm SD aus $n \geq 3$.

Neben AKR1B1 sind weitere Aldoketoreduktasen in Zusammenhang mit der Genexpression von Tumoren gebracht worden. Fukumozo et al. haben die Genexpression von verschiedenen Lungenkarzinomtypen, normalem Gewebe und anderen Tumorzelllinien mittels Mikroarrays verglichen. Sie fanden verschiedene Gene, die in Lungenkarzinomen überexprimiert werden, darunter die Aldoketoreduktasen AKR1B10 und **AKR1C1**.¹³¹ Für AKR1B10 postulierte Penning drei mögliche Gründe, warum es in nicht-kleinzelligen Lungentumoren hochreguliert ist. Zum einen könnte es Teil einer adaptiven Antwort auf zellulären Stress sein (als Folge des Rauchens), zum anderen könnte es direkt in den Metabolismus von Karzinogenen involviert sein, oder es könnte eine Rolle in Signalwegen rund um nukleäre Rezeptoren spielen.¹³²

AKR1C1 und AKR1C2, die Dihydrodiol-Dehydrogenasen 1 und 2, besitzen eine zu 98 % identische Aminosäuresequenz und eine zu 97 % identische 3'-UTR. Dennoch haben sie sehr unterschiedliche Substratspezifitäten und Funktionen. AKR1C1 katalysiert die Reaktion von Progesteron zum inaktiven 20α -Hydroxyprogesteron. AKR1C2 bindet mit hoher Affinität Gallensäuren und hat eine minimale 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-Aktivität.

Hsu et al. haben mittels *Differential Display* 384 NSCLC-Patientenproben bezüglich ihrer Genexpression untersucht. Dabei haben sie jeweils die Expression im Tumorgewebe mit der in angrenzendem normalem Gewebe verglichen und fanden in 82,5 % der Tumorproben eine mehr als 50fache Überexpression von AKR1C1.¹³² Eine hohe Expressionsrate konnten sie mit einer schlechten Verlaufsprognose korrelieren.¹¹⁰ Hsu et al. haben nicht nur, wie angegeben, die Expression von AKR1C1 untersucht, sondern auch die von AKR1C2. Ihre verwendeten Sequenzen sind nicht nur zu AKR1C1 komplementär, sondern auch zu beiden Isoformen von AKR1C2 (auf Grund der 97%igen Homologie der Gene auch kaum anders zu machen), ebenso wie die in dieser Arbeit verwendeten Primer AKR1C1/2. Bei der Genexpressionsstudie dieser Arbeit an 18 Zelllinien konnte für die sensitiven Zelllinien bezüglich der Basalexpression von AKR1C1/2 eine Korrelation beobachtet werden: Je sensitiver die Zellen waren, desto mehr AKR1C1/2 exprimierten sie. Die Aussage je sensitiver desto mehr AKR1C1/2 trifft auch bei der Auswertung nach NormIt (siehe Abbildung 4.18 B) auf das Zellpaar Cal27/ Cal27res zu, aber nicht auf das Zellpaar A2780/A2780cis. Diese beobachtete Korrelation widerspricht jedoch der Beobachtung von Hsu et al. In Cisplatin-resistenten Ovarialkarzinomzelllinien wurde ebenfalls eine verstärkte AKR1C1-Expression nachgewiesen, und eine stabil mit AKR1C1 transfizierte sensitive Zelllinie zeigte eine Resistenzentwicklung gegenüber Cisplatin.¹³³ Diese Daten und die Beobachtungen von Hsu et al. lassen vermuten, dass die in dieser Arbeit beobachtete Korrelation der AKR1C1/2-Expression mit dem Resistentgrad der Zellen zufällig war. Zu beachten ist dabei, dass in dieser Arbeit 14 verschiedene Gewebe untersucht wurden, Hsu et al. haben nur NSCLC-Patientenproben untersucht und somit wesentlich homogenere Proben gehabt.

AKR1B1 wurde bisher nur mit der Tumorentstehung, aber nicht mit einer Resistenzentwicklung gegen Cisplatin in Verbindung gebracht. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit bleibt es als Kandidatengen bestehen. Interessant wären weitergehende Experimente, die einen möglichen Zusammenhang der AKR1B1-Expression mit der Cisplatin-Resistenz von Tumorzellen untersuchen.

5.2.2 Proteolytische Enzyme und ihre Gegenspieler

Cystatin A (CSTA) wurde mit Hilfe der SSH als Kandidatengen identifiziert, das in der Cisplatin-sensitiven Zelllinie Cal27 nach Behandlung der Zelllinien mit 10 μ M Cisplatin stärker exprimiert wird als in der resistenten Zelllinie Cal27res. Die Beobachtung konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 4.13). Im Mikroarray (Untersuchung beider Zelllinien ohne vorherige Cisplatin-Behandlung) war CSTA eines der am stärksten in Cal27 hochregulierten Gene (Faktor 11,43, siehe Tabelle 4.4). Dass Cal27 im unbehandelten Zustand der Zellen deutlich mehr CSTA exprimiert als Cal27res zeigte sich auch bei der Genexpressionsstudie der 18 Zelllinien. Nach der Auswertung nach geNorm (siehe Abbildung 4.23 A) exprimiert Cal27 9fach mehr CSTA als Cal27res und nach der Auswertung nach NormIt (siehe Abbildung 4.23 B) 29fach mehr. Beide Auswertungsmethoden zeigen eine Abnahme dieses Faktors auf Cisplatin-Behandlung der beiden Zelllinien: geNorm von 9 auf 3 und NormIt von 29 auf 20. Die qRT-PCR-Bestätigung zeigte nach Cisplatin-Behandlung eine 6fache Überexpression in Cal27 (siehe Abbildung 4.13). Somit stimmen alle Methoden in der Aussage der Richtung der Expression überein. Dies ist zusammenfassend in Abbildung 5.2 dargestellt.

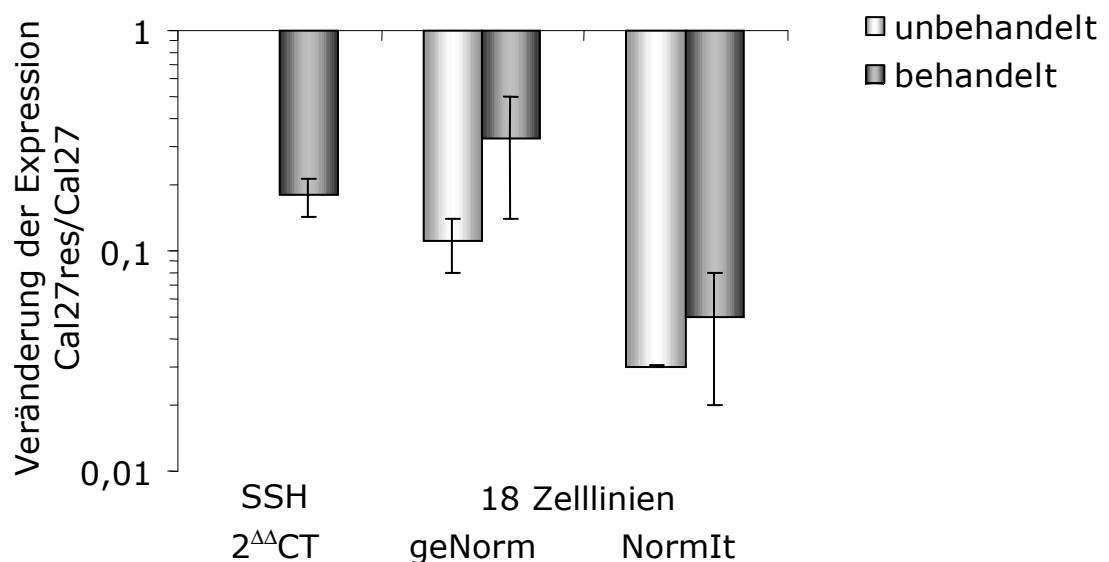


Abbildung 5.2: Vergleich der Expression von CSTA, ermittelt in der qRT-PCR-Bestätigung der SSH-Kandidatengene (ausgewertet mit der $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode) mit den nach geNorm und NormIt ausgewerteten Experimenten der 18-Zelllinien-Genexpressionsstudie. MW \pm SD aus $n \geq 3$.

Cystatin A wird der Superfamilie der Cystatine zugeordnet, die unter normalen physiologischen Bedingungen die Aktivität der Cathepsine, ihrer natürlichen Gegenspieler, kontrollieren. Innerhalb der Superfamilie gibt es drei inhibitorische Familien, die Typ1-Cystatine oder auch Stefine, die Typ2-Cystatine und die Kininogene. Die Typ1-Cystatine oder Stefine (Cystatin/Stefin A und Cystatin/Stefin B) sind intrazelluläre Inhibitoren, Typ2-Cystatine (Cystatin C, D, E, F, G, S, SN und SA) extrazelluläre Inhibitoren und die Kininogene intravaskuläre Inhibitoren der Cathepsine. Cystatine inhibieren Cathepsine, indem sie an eine benachbarte Region des katalytischen Zentrums binden und so den Substraten den Zugang verwehren.

Cathepsine sind Cysteinproteasen, die hydrolytische Spaltungen von Proteinen und Peptiden katalysieren. Die Klasse der Cysteinproteasen kommt vor allem im Lysosom der Zellen vor. Die Aktivität der Cathepsine ist abhängig vom lysosomalen pH-Wert. Das pH-Optimum liegt bei einem pH-Wert von 5. Cathepsine (CTs) spielen zentrale Rollen

- beim intrazellulären Proteinabbau (CTSB, CTHL, CTSL)¹³⁴,
- bei der Umbildung von Knochen (CTSK)¹³⁵,
- im Immunsystem bei der Kontrolle der Antigenpräsentation (CTSS)¹³⁶,
- in der Apoptose (CTSB)¹³⁷.

Während der Tumorprogression gibt es ebenfalls viele Protease-abhängige Vorkommnisse:¹³⁸

- die Invasion und Metastasierung
- die Angiogenese
- die Aktivierung der Zellproliferation
- die Inhibition der Apoptose
- die Beteiligung von weißen Blutkörperchen
- die Induktion der *multidrug*-Resistenz

CSTA ist ein Cystein-Protease-Inhibitor, der enge Komplexe sowohl mit Papain und auch den Cathepsinen B, h und L (CTSB, CTHL, CTSL) bildet. Kuopio et al. entdeckten eine aggressive Variante von Brusttumoren, die sich durch eine verstärkte, unnatürliche CSTA-Expression auszeichneten. Obwohl CSTA eigentlich ein Gegenspieler der Proteasen ist, waren die

Tumore größer, wiesen eine höhere Mitoserate auf, und das Risiko für die Patientinnen, an ihrem Tumor zu sterben, war signifikant erhöht.¹³⁹ Klinisch getestete Protease-Inhibitoren waren bisher bis auf einige wenige Anwendungsbereiche von Matrixmetalloprotease-Inhibitoren in Kombination mit zytostatisch wirksamen Stoffen nicht erfolgreich.¹³⁸

Von **CTSB** existieren zwei Splicevarianten. Die längere umfasst 14 Exons und wandert nach der Reifung in die Lysosomen, um dort ihrer Aufgabe, der Proteolyse, nachzukommen. Der kurzen, alternativen Splicevariante tCTSB (*truncated* CTSB) fehlen Exon 2 und 3, wodurch am N-terminalen Ende des Proteins eine Leitsequenz (*leader sequence*) entsteht, die den Eintritt der tCTSBs in die Mitochondrien und folgend die Apoptose vermittelt.¹⁴⁰ Erdal et al. konnten Substanzen identifizieren, die die Freisetzung von Cathepsin B und D aus den Lysosomen hervorrufen. Daraufhin konnte eine Bax-vermittelte, p53-unabhängige mitochondriale Apoptose-Induktion beobachtet werden, die durch den CTSD-Inhibitor Pepstatin A unterdrückt werden konnte.¹⁴¹ Also scheinen beide Splicevarianten von CTSB in der Lage zu sein, die mitochondriale Apoptose auszulösen: Das große CTSB indirekt nach Freisetzung aus den Lysosomen ins Cytosol und tCTSB durch direkte Wirkung auf die Mitochondrien. Hinweise auf die Existenz von tCTSB veröffentlichten Gong et al. bereits 1993.¹⁴²

Berquin und Sloane korrelierten 1996 die CTSB-Expressionslevel mit der Tumorprogression. Je maligner die von ihnen untersuchten Tumore waren, desto höhere CTSB-Aktivitäten zeigten sie. Besonders Zellen der invasiven Bereiche von Tumoren zeigten hohe CTSB-Aktivitäten. CTSB könnte das Tumorstadium und die Metastasierung entweder direkt oder indirekt durch Aktivierung weiterer Proteasen fördern, indem es die Überwindung der Extrazellulär-Membran(ECM)-Barriere bewirkt.¹⁴³

Bei der Auswertung der Genexpressionsstudien an 18 Zelllinien nach geNorm, gezeigt in den Abbildungen 4.17 C (CSTA) und 4.17 D (CTSB), lässt sich keine Korrelation zwischen der Genexpression von CSTA mit CTSB erkennen. Die meisten Zelllinien reagieren zwar mit einer Hochregulierung von CSTA, die sich aber deutlich bezüglich der CTSB-Expression unterscheiden: 1321N1, DU145, Hek293 und T24 sind vier Zelllinien, die CSTA hochregulieren und CTSB herunter. Die vier Zelllinien A2780, HepG2,

2102 und 2102KLE zeigen zu der Hochregulierung von CSTA ebenfalls eine Hochregulierung von CTSB. Die Zelllinien U937, MCF7, NW1539, A2780 und Cal27res zeigen keine ausgeprägte Änderung der CTSB-Regulierung auf Cisplatinbehandlung und ebenfalls eine Hochregulierung von CSTA. Dieses Bild ist recht ähnlich zu den Ergebnissen der Auswertung nach NormIt. Jedoch besteht durch NormIt noch die Möglichkeit, die absoluten Expressionen zu vergleichen. Dabei fällt auf, dass die Zelllinien die eine geringe Expression von CSTA aufweisen ($C_{T(Korrigiert)} > 28$) bis auf T24 auch eine geringe Expression ($C_{T(Korrigiert)} > 23$) von CTSB zeigen.

Eine weitergehende Aussage, inwieweit CSTA und CTSB spezifisch auf die Cisplatinbehandlung differentiell exprimiert werden, kann aus diesen Ergebnissen nicht formuliert werden. Ebenso wenig ist ein spezielles Muster erkennbar, warum die Zelllinien so unterschiedlich reagieren. Im Zusammenhang mit Expressionsstudien von Proteasen und ihren Inhibitoren wären Aktivitäts- und Lokalisationsstudien dieser Enzyme sinnvoll. CSTA ist noch nicht in Zusammenhang mit einer Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Cisplatin gebracht worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit und des Mikroarrays zeigen, dass CSTA ein interessantes Kandidatengen im Zusammenhang mit dem Phänomen der Cisplatin-Resistenz ist. Es wird auf Cisplatin-Behandlung in einer Vielzahl der in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien verstärkt exprimiert, und im Mikroarray zeigt es sich als eines der am stärksten in der sensitiven Zelllinie Cal27 überexprimierten Gene.

5.2.3 Der Tumorsuppressor p53

p53 wird „Wächter des Genoms“ genannt, da seine Aufgabe als Tumorsuppressorgen darin besteht, Zellen daran zu hindern, fehlerhafte Informationen einer geschädigten DNA während der Zellteilung an die Tochterzellen weiterzugeben. p53 reguliert, gebunden an DNA, als Transkriptionsfaktor nach einer Schädigung der DNA die Expression von Genen, die an der Kontrolle des Zellzyklus, an der DNA-Reparatur und an der Induktion der Apoptose beteiligt sind. Der Zyklusarrest gibt der Zelle Zeit, den DNA-Schaden zu reparieren. Während des Zellzyklus (dargestellt in Abbildung 5.3) gibt es zwei so genannte *checkpoints*, Kontrollpunkte, die normalerweise nicht überschritten werden, wenn Fehler im Genom auftreten.

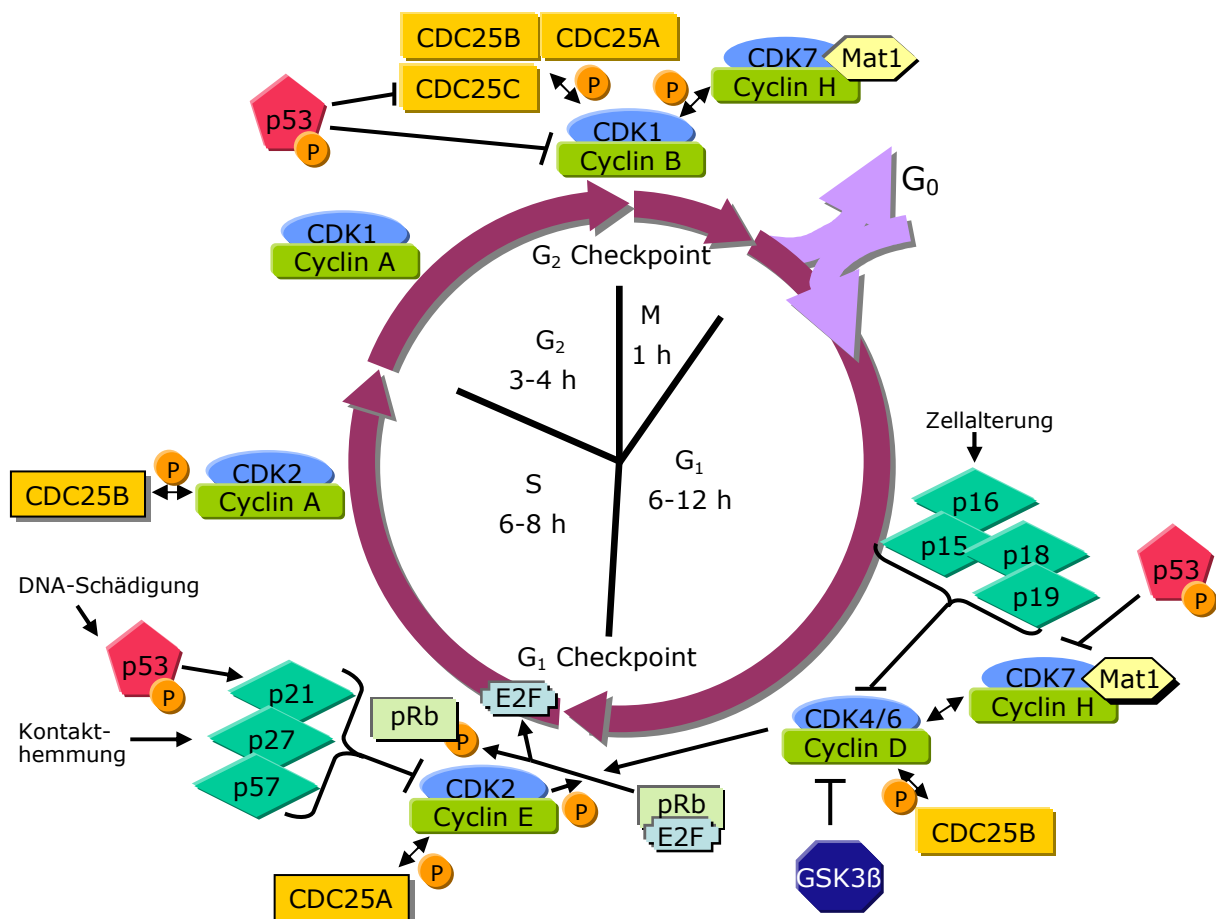


Abbildung 5.3: Kontrolle des Zellzyklus durch p53, den „Wächter des Genoms“. P = Kontrolle durch Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen, M = Mitose, G₁ = postmitotische Wachstumsphase, S = Synthesephase, G₂ = prämitotische Wachstumsphase, G₀ = Ruhephase; weitere Erklärungen im Text.

Sowohl der Übergang von der G₁- zur S-Phase als auch der Übergang von der G₂- zur M-Phase wird von p53 kontrolliert. Phosphoryliertes p53 induziert p21, das den Cyclin-E/CDK2-Komplex hemmt (G₁ – S, siehe Abbildung 5.3). Andere Faktoren inhibieren den Cyclin-D/CDK4/6-Komplex. Diese Komplexe sorgen in aktivem Zustand für eine Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F, der den Zellzyklus vorantreibt. Viele andere Faktoren sind am Fortgang des Zellzyklus beteiligt, bleiben hier jedoch unerwähnt. Der Übertritt der Zelle von der G₂- zur M-Phase wird ebenfalls durch p53 über den Cyclin-B/CDK1-Komplex kontrolliert. Wird eine Schädigung der DNA während des Zellzyklus erkannt, kommt es durch p53 zu einem Zellzyklusarrest (siehe Abbildung 5.4). Phosphoryliertes p53 tetramerisiert, wodurch es den Zellkern nicht verlassen kann und vor dem Abbau geschützt ist.¹⁴⁴

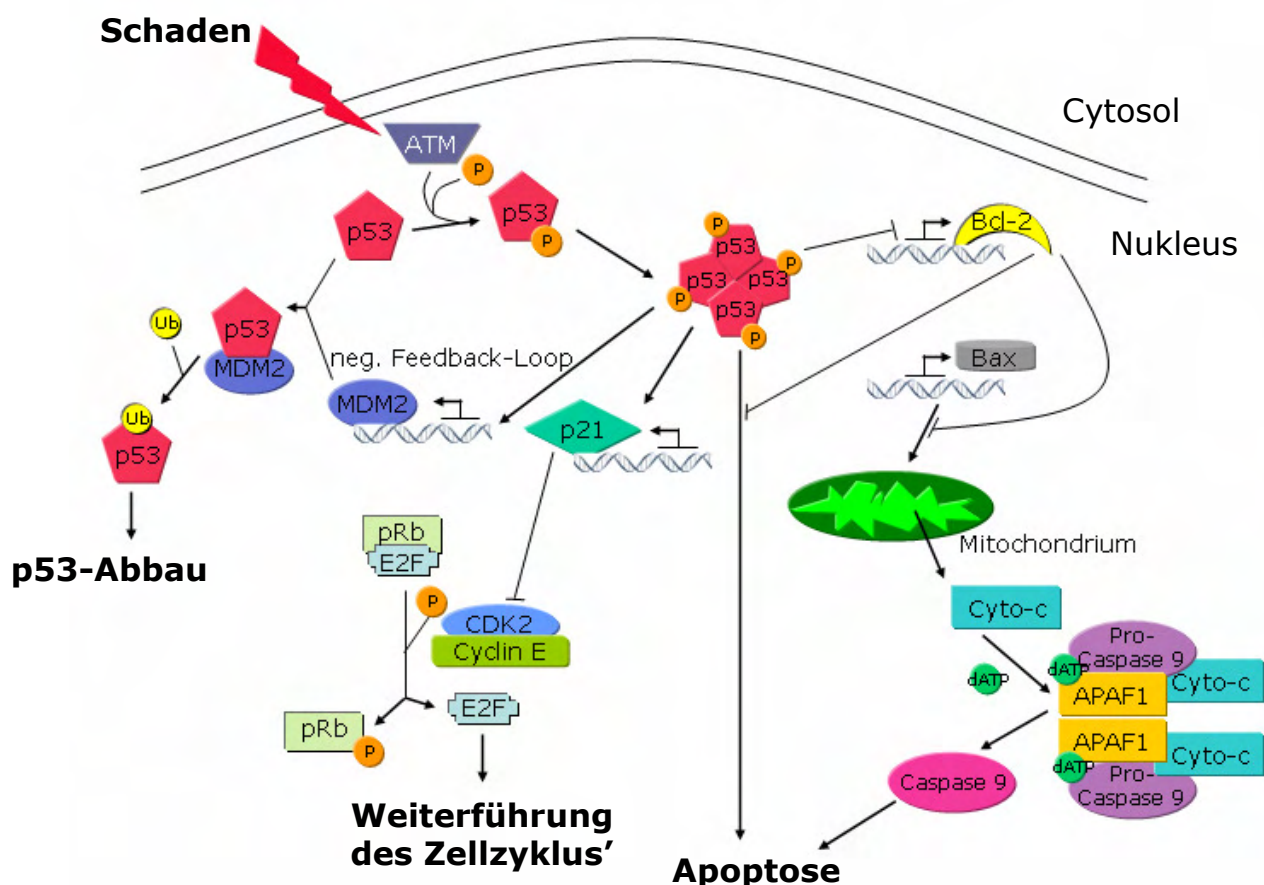


Abbildung 5.4: p53 als „Wächter des Genoms“. Nach einem Zellschaden kommt es im Zellkern zur ATM(*ataxia telangiectatica mutated*)-abhängigen Phosphorylierung von p53, das daraufhin tetramerisiert und als Transkriptionsfaktor für ca. 60 Zielgene agiert.

Dieses aktivierte p53 ist ein Transkriptionsfaktor für ca. 60 verschiedene Zielgene. Durch unterschiedliche Phosphorylierungen des p53 werden verschiedene DNA-Bindungsstellen bevorzugt, und es kommt zur selektiven transkriptionellen Aktivierung entsprechender Zielgene. Aktiviertes p53 kann die Expression von p21 induzieren, was, wie bereits erwähnt, zum Zyklusarrest führt. Es kann aber auch die Expression von Bcl-2 hemmen, wodurch es zu einer Verschiebung des Bcl-2/Bax-Verhältnisses und dadurch hervorgerufen zu einer Cytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien kommt.¹⁴⁵ Dies initiiert den intrinsischen Weg der Caspase-Kaskade.

Phosphoryliertes Wildtyp-p53 ist ein Transkriptionsfaktor für MDM2 (*murine double minute Gene 2*), das freies, unphosphoryliertes p53 komplexiert und der Ubiquitin-vermittelten Proteolyse zugänglich macht. Dieser negative Feedback-Loop sorgt dafür, dass normalerweise nur geringe Mengen p53 in der Zelle vorhanden sind. Wenn p53 aufgrund von Mutationen nicht phosphoryliert wird, kann es die Apoptose bzw. den Zyklusarrest nicht einleiten, und die geschädigte Zelle lebt und teilt sich weiter. Gewisse Mutationen von p53 sind im Zusammenhang mit bestimmten Lungenkarzinomen identifiziert¹⁴⁶, und eine bekannte Mutation ist verantwortlich für eine erhöhte individuelle Cancerogenität von Aflatoxin.¹⁴⁷ Ist nur ein Allel von einer Mutation des p53 betroffen, kann es trotz rezessiver Mutation dazu kommen, dass das mutierte p53 aufgrund einer längeren Halbwertszeit über das gesunde Allel dominiert. Man nennt dieses Verhalten „dominant negativ“.

Die p53-Mutationsprofile der 18 in dieser Arbeit mittels qRT-PCR untersuchten Zelllinien wurden nicht bestimmt. Daher kann aufgrund der Expressionsdaten keine definitive Aussage über etwaige Konsequenzen gemacht werden, da die Effekte von Wildtyp-p53 und mutiertem p53 in Zellen sehr verschieden sind. Auffällig ist aber, dass 15 von 18 der mittels qRT-PCR in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien auf die Cisplatin-Behandlung mit einer signifikant gesteigerten Expression von p53 reagieren (sowohl bezogen auf die Auswertung nach geNorm und auch NormIt). Auch Li et al. fanden nach der Behandlung der p53-Wildtyp-Zelllinie A2780 und einer Cisplatin-resistenten Subzelllinie ACRP mit Cisplatin eine gesteigerte Expression von p53.¹⁴⁸ Sie fanden heraus, dass ein Knockdown von p53 in den resistenten Zellen zu einer weiteren Resistenzbildung führte.¹⁴⁸ In

dieser Arbeit zeigten die drei Zelllinien HT29, K562 und Kyse510 keine Induktion der p53-Expression auf die Cisplatinbehandlung (Kyse510 und HT29 in der Auswertung nach geNorm und NormIt, K562 nur nach NormIt keine signifikante Induktion). K562 und HT29 sind nach Caco2 und Cal27res die resistantesten der 18 untersuchten Zelllinien. Dies könnte seinen Grund darin haben, dass diese Zellen keine ausreichenden p53-Spiegel haben, um durch eine Phosphorylierung des p53 die Apoptose zu induzieren.

5.2.4 Thrombospondin-1

Thrombospondin-1 (THBS1) ist ein weiteres, sehr interessantes Kandidatengen. Es wurde in der SSH als überexprimiert in Cal27res gefunden, jedoch zeigte sich bei der qRT-PCR-Bestätigung aus der gleichen mRNA eine Überexpression in Cal27 (siehe Abbildung 4.13). Bei der später durchgeführten qRT-PCR von Cal27 und Cal27res im Rahmen der Studie der 18 Zelllinien zeigte sich im unbehandelten Zustand eine 9fache Überexpression in Cal27res (siehe Abbildung 4.23 A). Der ebenfalls mit unbehandelten Zellen durchgeführt Mikroarray zeigte wieder eine Überexpression von THBS1 in Cal27 (siehe Tabelle 4.4). Obwohl sich die Zellen bezüglich ihrer Resistenz gegen Cisplatin über die Jahre (siehe Tabelle 4.1) und auch in der Expression der anderen Kandidatengene zwischen SSH und Mikroarray (siehe Tabelle 4.4) wenig verändert haben, scheint gerade die THBS1-Sezernierung nicht konstant zu sein. Die qRT-PCR-Bestätigung nach der SSH (siehe Abbildung 4.13) und die geNorm- und NormIt-Auswertungen (siehe Abbildung 4.23 A und B) sind in Abbildung 5.5 zusammengefasst.

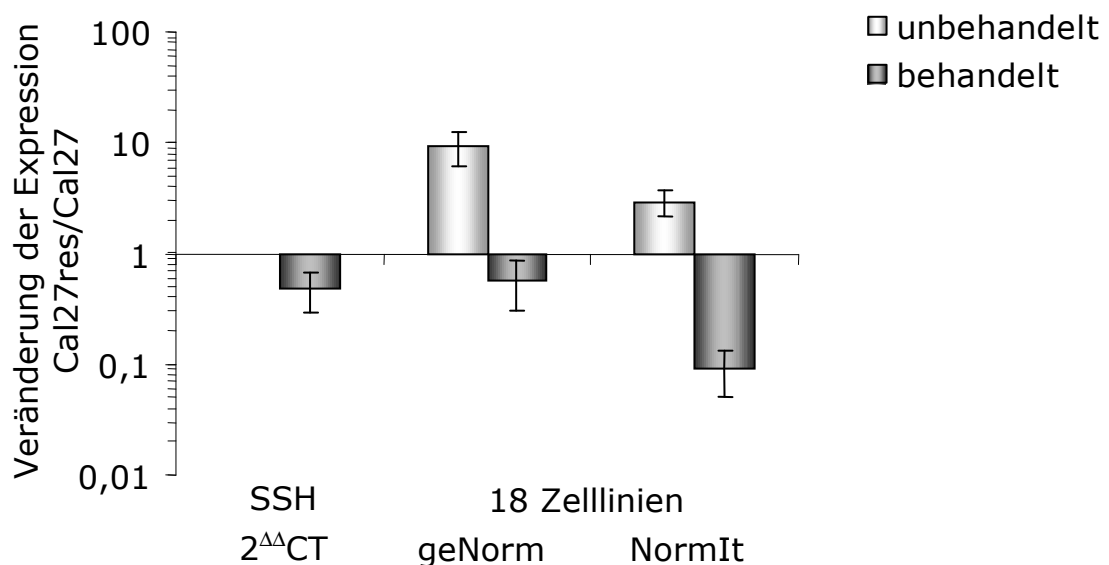


Abbildung 5.5: Vergleich der Expression von THBS1, ermittelt in der qRT-PCR-Bestätigung der SSH-Kandidatengene (ausgewertet mit der 2^{ΔΔCT}-Methode) mit den nach geNorm und NormIt ausgewerteten Experimenten der 18-Zelllinien-Genexpressionsstudie. MW ± SD aus n ≥ 3.

Sowohl geNorm als auch NormIt bestätigen die in der qRT-PCR-Bestätigung der Kandidatengene gefundene Überexpression von THBS1 in behandeltem Zustand in der Zelllinie Cal27, obwohl THBS1 ursprünglich nach den SSH-Ergebnissen in der resistenten Zelllinie Cal27res überexprimiert erschien (siehe Tabelle 4.2). Bei der Betrachtung des Einflusses der Cisplatin-Behandlung (siehe Abbildung 4.22) zeigen sich signifikante Unterschiede zwischen Cal27 und Cal27res. Nur die sensitive Zelllinie Cal27 induziert THBS1, Cal27res dagegen nicht. Vergleicht man beide Zelllinien im Basalzustand, exprimiert Cal27res mehr THBS1 als Cal27. Dieses Verhältnis kehrt sich jedoch nach einer Cisplatin-Behandlung um (siehe Abbildung 4.23).

Interessant ist, dass das zweite untersuchte Zellpaar A2780/A2780cis keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Zelllinien im Ausmaß der Induktion von THBS1 auf Cisplatin-Behandlung zeigt (siehe Abbildung 4.24). Bei der Betrachtung des Einflusses der Resistenz (siehe Abbildung 4.25) zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Verhältnisses zwischen unbehandelten und behandelten Zellen. Der Unterschied ist aber nicht groß. Betrachtet man die mittels NormIt normierten C_T -Werte, erkennt man, dass beide A2780-Zelllinien im Vergleich mit allen anderen Zelllinien basal die niedrigsten THBS1-Spiegel aufweisen, A2780cis noch etwa 30fach weniger als A2780. Beide A2780-Zelllinien weisen mit Cal27 und K562 die stärkste Induktion von THBS1 auf die Cisplatin-Behandlung auf (siehe Abbildung 4.18 I).

THBS1 ist ein adhäsives Glykoprotein, das von vielen Zellen sezerniert und mit vielen Funktionen wie Zellbewegungen, Zellproliferation, Neuritenwachstum und Angiogenese in Verbindung gebracht wird.¹⁴⁹ Besonders in der Angiogenese spielt THBS1 als Inhibitor eine entscheidende Rolle, denn durch diese Funktion ist es u. a. in der Lage, das Tumorstadium und die Metastasenbildung zu kontrollieren.¹⁵⁰ Ein Tumor kann ohne eigene Blutzufuhr nur etwa die Größe eines Stecknadelkopfes erreichen, da eine erfolgreiche Etablierung eines Tumors immer eine Gefäßneubildung voraussetzt.¹⁵¹ Endogene Inhibitoren der Angiogenese sind in der Lage, Gefäßneubildungen (die im Erwachsenenalter meist pathologisch sind) zu unterdrücken. Unter diesem Gesichtspunkt ist z. B. ABT-510 entwickelt worden, das ein Nonapeptid-Analogon zu THBS1 ist und eine etwa 1 000fach stär-

kere Angiogenese-Inhibition zeigt als das ganze Protein THBS1. Es wird in Phase II der klinischen Studien zur Behandlung solider Tumore geprüft.¹⁵² Es ist bekannt, dass die Kombination antiangiogenetischer Arzneistoffe mit konventionell verabreichten Zytostatika die Effektivität der Tumorbehandlung des Zytostatikums potenzieren kann.^{153;154} Ob dies im Zusammenhang einer möglichen Überwindung einer Resistenz gegen die Zytostatika steht, ist nicht beschrieben.

Ein altbekannter Angiogenese-Inhibitor ist Thalidomid, durch dessen Blockade von Wachstumsfaktoren es nicht zu einer Vaskularisierung und so zu einer verkürzten Anlage der Extremitäten von Embryos kommt. Heute wird Thalidomid zur Behandlung der Lepra und des multiplen Myeloms eingesetzt.^{155;156} Der genaue Wirkmechanismus von Thalidomid in der Krebstherapie ist noch unklar, Thalidomid scheint aber zusätzlich zur Antiangiogenese noch weitere Wirkungen zu haben.¹⁵⁶ Der Erfolg in der Antitumorthherapie scheint auf immunmodulierende, antiproliferative und proapoptotische Eigenschaften zurückzuführen zu sein.¹⁵⁷

THBS1 wird durch Wildtyp-p53 hochreguliert¹⁵⁸, mutiertes p53 mindert die Expression von THBS1.¹⁵⁹ THBS1 wird aber auch als proapoptotisch beschrieben, es induziert die Apoptose durch eine Aktivierung der Caspase-3 und durch die Modulation des Bax/Bcl-2-Verhältnisses.¹⁶⁰ Zu dieser Aussage passen die Beobachtungen der qRT-PCR der 18 Zelllinien. Mit Ausnahme von U937 (keine detektierbare Expression, $C_T > 40,0$), Cal27res (keine Änderung), HepG2, Hek293 und Caco2 (keine Änderung bzw. Abnahme abhängig von der Auswertung nach geNorm oder NormIt) wird die THBS1-Expression signifikant auf Cisplatin-Behandlung induziert. Dies könnte auf eine überwiegend pro-apoptotische Wirkung hindeuten, die aufgrund der Zytostatikabehandlung auch zu erwarten wäre.

Ein interessanter Ansatzpunkt wäre die Untersuchung der Expression des Wachstumsfaktors VEGF, da THBS1 und VEGF sowohl als Gegenspieler als auch gleichgerichtet in Tumoren agieren können.^{161;162} Im Mikroarray zeigte sich für VEGF-A (Faktor 1,54 in Cal27res überexprimiert) und VEGF-C (Faktor 1,42 in Cal27 überexprimiert) eine im Basalzustand der Zellen differentielle Expression. Ebenso wäre ein ELISA zur Untersuchung von THBS1 und VEGF interessant, besonders um parallel die Proteinspiegel von

THBS1 und VEGF messen und deren Einfluss auf eine Cisplatinresistenz untersuchen zu können.

Bastian et al. fanden heraus, dass Prostata-Tumorgewebe eine geringere Expression von THBS1 zeigt als immortalisiertes normales Prostatagewebe. Exogen zugeführtes THBS1 wirkte im untersuchten Prostatatumor proapoptotisch und führte zu einer Verlangsamung des Zellwachstums.¹⁶³ Es gibt jedoch eine Reihe von Publikationen, die THBS1 als proangiogen einstufen. Zum Beispiel haben Poon et al. das Nierentumorgewebe von 60 Patienten in Bezug auf die VEGF- und THBS1-Expression untersucht. THBS1-Protein-Level korrelierten mit den VEGF-Protein-Leveln ebenso wie mit der Vaskularisierung des Tumorgewebes und dem Tumorstadium. Aufgrund dieser Datenlage vermuten sie bei Nierentumoren in THBS1 einen angiogenesestimulierenden Faktor.¹⁶¹ Ein möglicher Grund für die kontroverse Datenlage ist, dass Thrombospondin-1 aus verschiedenen Domänen besteht (siehe Abbildung 5.6) und diese durch Interaktionen mit verschiedenen Rezeptoren umgebungsabhängige Reaktionen hervorrufen können.

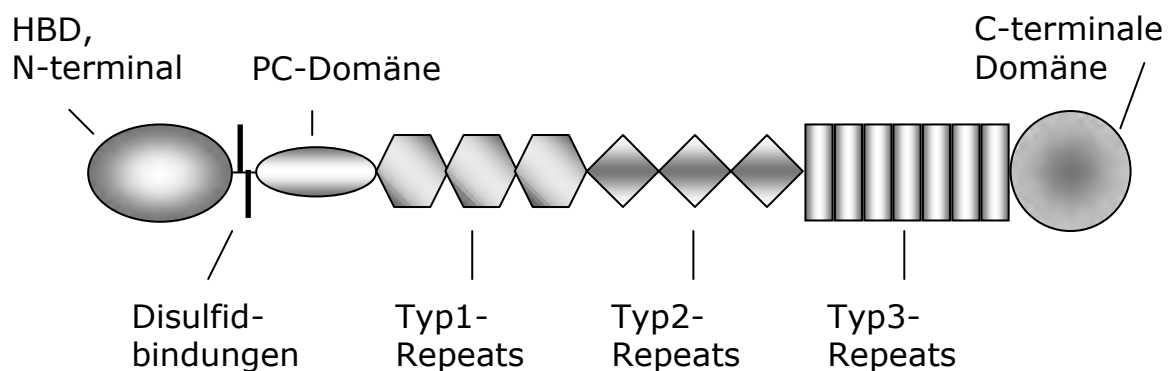


Abbildung 5.6: Schematische Struktur von Thrombospondin-1. HBD = heparinbindende Domäne, PC = procollagen-like.

THBS1 besteht aus einer N-terminalen heparinbindenden Domäne (HBD = *heparin binding domain*), die etwa 240 Aminosäuren (aa) lang ist, gefolgt von einer kurzen Region, in der über Disulfid-Brücken (siehe Abbildung 5.6) die Homotrimere des Thrombospondins ausgebildet werden. Dann folgen die PC-Domäne (*procollagen-like*) mit ca. 90 aa, die Typ1-Repeats- und die Typ2-Repeats-Domäne (*EGF(epidermal growth factor)-like*) mit je ca.

60 aa, die calciumbindende Typ3-Repeats-Domäne (ca. 200 aa) und eine C-terminale, ca. 220 aa lange Domäne. All diese Domänen interagieren mit mindestens einem Dutzend Rezeptoren, darunter verschiedene Integrine, CD36, CD47, Heparinsulfat-Proteoglykan und LRP.

Proangiogenetische Effekte werden sowohl durch Bindung der C-terminalen Domäne an CD47 vermittelt als auch über die heparinbindende N-terminale Domäne.¹⁶⁴ Antiangiogenetische Effekte werden durch die Bindung der Typ1-Repeats-Domäne (und eventuell der PC-Domäne) an CD36 vermittelt. CD36 vermittelt auch die Apoptose. Nach der Bindung von THBS1 an CD36 kommt es zu einer vermehrten Expression des Fas-Liganden und einer Aktivierung des Fas-Rezeptors, was wiederum zu einer Aktivierung der Caspasen und so zur Apoptose führt.¹⁶⁵ Sowohl über die heparinbindende als auch die an CD47 bindende C-terminale Domäne kann die T-Zell-Antwort des Immunsystems negativ als auch positiv reguliert werden.¹⁶⁶ Mit einer genaueren Untersuchung, z. B. durch CD36-Rezeptorblockade, könnte man den Stellenwert der Apoptose-Induktion durch THBS1 auf die Cisplatinbehandlung ermitteln.

Von den mit THBS1 zusammenhängenden Proteinen konnten im Mikroarray einige Gene neben den bereits erwähnten VEGF und VEGF-C als differentiell exprimiert identifiziert werden: Die Integrine und LRPs sind, mit Ausnahme von ITGA3 und ITGA6, in Cal27res höher exprimiert als in Cal27. Warum und mit welchen Effekten, ist nicht abzuschätzen. Gleich exprimiert zwischen Cal27 und Cal27res sind die Adhäsionsmoleküle CD36 und CD47. Bezüglich der Apoptose-vermittelnden Gene ist anzumerken, dass sowohl Bax (Faktor 1,31) also auch Bcl2-artige-Moleküle (Bcl2A1 -1,79, Bcl2L12 -1,44 und Bcl2L13 -1,45) in Cal27res überexprimiert sind, jedoch weder Caspase 3 noch Fas-Liganden und Fas-Rezeptoren.

Es ist nicht möglich, aufgrund der Literaturhinweise und Ergebnisse dieser Arbeit zu beurteilen, ob und welche Rolle THBS1 in der Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Cisplatin spielt. Da es aber von den meisten untersuchten Zelllinien auf Cisplatin-Behandlung – auch im Vergleich mit den anderen untersuchten Genen – deutlich induziert wird, bleibt es als interessantes Kandidatengenes für weitere Untersuchungen zum Phänomen der Cisplatinresistenz von Tumoren bestehen.

5.2.5 Ribosomale Proteine

Das Ribosom ist die Proteinfabrik der Zelle. In ihr wird die genetische Information in Form der mRNA interpretiert, die entsprechende Proteinkette synthetisiert und in die richtige Sekundärstruktur gebracht. Zellen, die sich teilen, weisen in der Regel mehr ribosomale Proteine (RPs) auf als die ruhenden Zellen.^{167;168} RPs können indirekt Zellwachstum und Entwicklung kontrollieren: Zum einen, indem sie die Translation unterbinden, zum anderen aber auch über extraribosomale Funktionen, die noch nicht komplett verstanden sind. So kann z. B. RPS3 neben seiner „normalen“ Aufgabe als ribosomales Protein auch als Endonuklease während der DNA-Reparatur und als Apoptose-Induktor agieren.¹⁶⁹ Beim Vergleich von Cisplatin-resistenten und Cisplatin-sensitiven Zelllinien werden immer wieder ribosomale Proteine (RPs) als differentiell exprimiert gefunden, ohne dass ihnen eine große Bedeutung zugemessen wird.¹⁷⁰⁻¹⁷⁷

Kasai et al. untersuchten Gewebeproben von Kolontumoren und nicht-malignes Vergleichsgewebe auf ihre Expression von zwölf RPs. Je besser das Tumorgewebe differenziert war, desto höher war die Expression von RPS18, RPS24, RPL18 und RPL32. Sie fanden aber auch, dass RPSA, RPS8, RPS28, RPS24, RPL13A, RPL18, RPL32 und RPL35A im Krebsgewebe schwächer exprimiert wurden als im Vergleichsgewebe. RPS11 und RPS7 waren im Tumorgewebe deutlich stärker exprimiert als im Vergleichsgewebe und fanden sich verstärkt in bestimmten Regionen der Krebszellen. Für RPS11 kommen sie zu der Hypothese, dass RPS11 die Apoptose von Krebszellen inhibieren könnte.¹⁷⁸ Bee et al. fanden RPL19 in Prostata-Karzinomen überexprimiert und konnten eine hohe Expressionsrate mit einem geringen Überleben der Patienten korrelieren.¹⁷⁹ Dass RPS12 an der Karzinogenese von squamösen Zervixkarzinomen beteiligt ist, konnten Cheng et al. zeigen.¹⁸⁰

Einige RPs konnten mit der Apoptose in Zusammenhang gebracht werden. Während der Apoptose konnte eine Abnahme der mRNA-Level von RPL21, RPL27, RPL31, RPL35 und RPS20 beobachtet werden.^{181;182} Chen und Ioannou erklären dies damit, dass eine sterbende Zelle keine Proteinbiosynthese mehr betreiben muss.¹⁸³ Die herunterregulierte Expression von RPs ist also eine Folge der eingeleiteten Apoptose. RPs scheinen aber auch

selbst an der Regulierung der Apoptose beteiligt zu sein, so z. B. RPS3A, für das es jedoch widersprüchliche Aussagen gibt: Hu et al. sagen, dass RPS3A die Zellen für die Apoptose sensitiviert¹⁸⁴, Naora et al. sagen, dass RPS3A von vielen Tumorzellen verstärkt exprimiert wird und dass eine Unterdrückung der RPS3A-Expression die Apoptose induziert.¹⁸⁵

Als pro-apoptotisch sind RPL13A¹⁸⁶, RPS29¹⁸⁷ und RPS3¹⁸⁸ beschrieben. Dagegen sollen RPL7¹⁷⁸, RPLS11¹⁷⁸ und RPS13¹⁷² Inhibitoren der Apoptose sein. Von RPL5, RPL11 und RPL23 ist bekannt, dass diese spezifisch MDM2 hemmen und so den p53-Abbau unterbinden.^{189;190} Dai et al. vermuten, dass alle drei ribosomalen Proteine RPL5, RPL11 und RPL23 zusammen mit MDM2 einen Komplex bilden und dieser den p53-Abbau inhibiert.¹⁹¹

Das als differentiell exprimiert gefundene RPL5 ist in den 18 untersuchten Zelllinien nur moderat reguliert, in einigen Zelllinien ist die Expression nach Cisplatin-Behandlung etwas größer, in anderen etwas geringer. Eine Korrelation der Cisplatin-Resistenz mit der differentiellen Expression von p53 war nicht möglich und ein Zusammenhang der p53-Expression und der RPL5-Expression nicht auszumachen.

Anhand der NormIt-Auswertung wird deutlich, dass die basalen Unterschiede der Expression von RPL5 zwischen allen Zelllinien deutlich geringer sind als bei den anderen untersuchten Genen. Beim Vergleich der Ergebnisse (zusammengefasst in Abbildung 5.7) fällt auf, dass einzig NormIt sowohl im unbehandelten Zustand der beiden Zelllinien Cal27 und Cal27res als auch nach Cisplatin-Behandlung eine höhere Expression von RPL5 in der sensitiven Zelllinie Cal27 zeigt. Die SSH dagegen identifizierte RPL5 als in Cal27res überexprimiertes Kandidatengen, was in der qRT-PCR nicht bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 5.7).

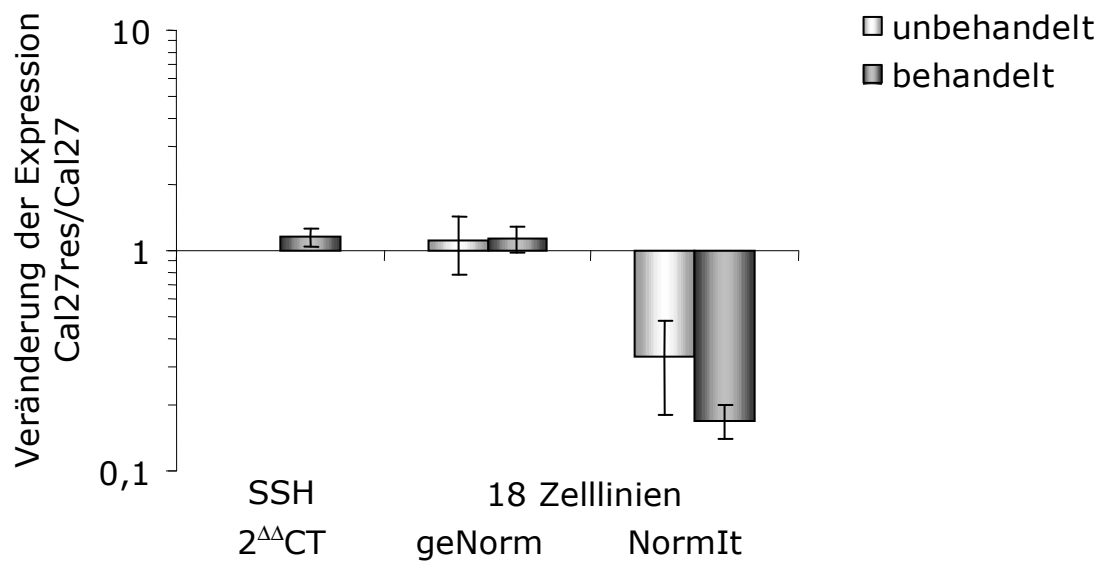


Abbildung 5.7: Vergleich der Expression von RPL5, ermittelt in der qRT-PCR-Bestätigung der SSH-Kandidatengene (ausgewertet mit der $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode) mit den nach geNorm und NormIt ausgewerteten Experimenten der 18-Zelllinien-Genexpressionsstudie. MW \pm SD aus $n \geq 3$.

Eine Kinetik, in der man eventuelle Reaktionen des einen Gens auf das andere erkennt, wäre für weitere Untersuchungen sinnvoll. Ebenfalls wäre eine Untersuchung des Mutations- und Phosphorylierungsstatus' von p53 interessant, um Aussagen über die p53-Aktivität treffen zu können, eventuell auch im Zusammenhang mit der Expression von RPL5.

Inwieweit ribosomale Proteine in Zusammenhang mit der Cisplatinresistenz stehen, oder ob ihre wiederholte differentielle Expression als unspezifisches Artefakt auf die Stresssituation zu werten sind, ist zu klären. Aufgrund der hier zusammengefassten Ergebnisse dieser Arbeit ist es jedoch nicht weiter als Kandidatengen aufrecht zu erhalten.

5.2.6 *Early growth response 1 (EGR1)*

Das Protein, das von EGR1 kodiert wird, gehört zu der EGR-Familie der Zinkfinger-Proteine. Es ist ein nukleäres Protein und agiert als Transkriptionsregulator.¹¹² Zielgene, die von EGR1 aktiviert werden, sind involviert in Differenzierung und Mitogenese (Induktion der Mitose). Es ist ein *immediate early gene*-Produkt, da es schnell und transient durch verschiedene Stimuli wie Wachstumsfaktoren¹⁹², Zytokine¹⁹³, Hormone¹⁹⁴, mechanische Verletzungen¹⁹⁵ und auch durch Cisplatin¹⁹⁶ induziert wird. Reifes EGR1 ist 533 Aminosäuren lang und hat eine starke N-terminale transkriptionsaktivierende Domäne zwischen den Aminosäuren 1 und 281.¹⁹⁷

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass EGR1 ein Tumorsuppressorgen ist. Huang et al. konnten zeigen, dass eine Reihe von Tumorzelllinien kein oder weniger EGR1 exprimierten als normale Zellen des gleichen Gewebes.¹⁹⁸ Einig sind sich die Forscher darin, dass eine hohe EGR1-Expression gesunde Zellen vor der Transformation schützt.¹⁹⁹⁻²⁰¹ Welche Rolle EGR1 in der Apoptose spielt, ist weniger klar. In bestimmten Tumoren, die normalerweise nur wenig EGR1 exprimieren, führt eine verstärkte Expression von EGR1 aufgrund der antiapoptotischen Eigenschaften zu einer höheren Überlebensrate der Zellen.²⁰² Adamson und Mercola sagen aber auch, dass dies im Widerspruch zu der Erkenntnis steht, dass EGR1 die Apoptose in manchen Tumoren induziert.²⁰² Auch Lucerna et al. schreiben EGR1 proapoptotische Eigenschaften in stabil mit EGR1 transfizierten Endothelzellen zu.²⁰³ Eine Erklärung für die beobachteten Widersprüche wäre, dass mutiertes p53 und Wildtyp-p53 unterschiedlich agieren. Weisz et al. konnten zeigen, dass mutiertes p53 ein Transkriptionsfaktor für EGR1 ist und eine durch mutiertes p53 induzierte EGR1-Expression zu einer gesteigerten Transformation und zu einer Apoptose-Resistenz der Zellen führten. EGR1 wäre damit ein Wirkungsverstärker für mutiertes p53.²⁰⁴

Ohne den Mutationsstatus des p53 aller untersuchten Zelllinien zu kennen, ist es schwierig, Aussagen zu treffen, warum die einen Zelllinien mit einer stärkeren Expression von EGR1 auf Cisplatinbehandlung reagieren als die anderen. Besonders auffällig sind die beiden Zelllinien A2780 und U937, die mit etwa 100fachen Hochregulierungen von EGR1 auf die Cisplatin-Behandlung reagieren.

Bei dem Vergleich der beiden untersuchten Zellpärchen Cal27/Cal27res und A2780/A2780cis fällt auf, dass die beiden Cal27-Zelllinien keine signifikanten Unterschiede in ihrer Expression von EGR1 weder bei der Betrachtung des Einflusses der Cisplatin-Behandlung (siehe Abbildung 4.22) noch bei der Betrachtung des Einflusses der Resistenz (siehe Abbildung 4.23) zeigen. Nach der Normierung der C_T -Werte mittels NormIt (dargestellt in Abbildung 4.18 F) sind die C_T -Werte der untersuchten Proben Cal27 unbehandelt ($C_T\text{-Wert}_{\text{norm}} = 27,6$), Cal27 behandelt ($C_T\text{-Wert}_{\text{norm}} = 25,9$), Cal27res unbehandelt ($C_T\text{-Wert}_{\text{norm}} = 26,0$) und Cal27res behandelt ($C_T\text{-Wert}_{\text{norm}} = 25,1$) nicht sehr verschieden.

Ein deutlich anderes Bild zeigt das Zellpaar A2780/A2780cis. Bei der Betrachtung des Einflusses der Cisplatin-Behandlung nach geNorm (siehe Abbildung 4.24) reagiert die sensitive Zelllinie A2780 mit einer 136fachen Induktion von EGR1 auf die Cisplatin-Behandlung, die resistente Zelllinie A2780cis nur mit einer 2fachen Induktion. Wie sich bei der Betrachtung des Einflusses der Resistenz (siehe Abbildung 4.25) zeigt, weist die resistente Zelllinie A2780cis in unbehandeltem Zustand eine 43fach höhere Expression von EGR1 als die sensitive Zelllinie A2780 auf. Auf Cisplatin-Behandlung ist dieser Unterschied nicht mehr zu sehen. Diese Beobachtung wird durch die Ermittlung der korrigierten C_T -Werte nach NormIt bestätigt (siehe Abbildung 4.18 F). Die sensitive Zelllinie A2780 zeigt basal einen normierten C_T -Wert von 32,3, die resistente Zelllinie A2780cis einen normierten C_T -Wert von 25,9. Nach der Cisplatin-Behandlung gleichen sich die Expressionsunterschiede aus, A2780 zeigt einen normierten C_T -Wert von 23,4, A2780cis einen normierten C_T -Wert von 22,5. Die resistente Zelllinie A2780cis scheint EGR1 dauerhaft hochzuregulieren, im Gegensatz zu der sensitiven Zelllinie A2780, die auf Cisplatin-Behandlung dagegen transient mit einer umso größeren Induktion von EGR1 reagiert. Auch Adamson und Mercola berichten von Tumoren, die kontinuierlich verstärkt EGR1 exprimieren und so das Tumorstadium fördern.²⁰² Dieses unterschiedliche Verhalten der beiden A2780-Zelllinien gibt einen Hinweis, dass EGR1 eventuell einen Beitrag zur Resistenzentwicklung von Tumorzellen gegen Cisplatin beitragen kann. Es wäre daher interessant, EGR1 im Zusammenhang mit Cisplatin-Resistenz weiter zu untersuchen.

5.3 Das Kandidatengen Dickkopf 1 (DKK1)

Das identifizierte Kandidatengen DKK1 ist ein Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalweges. Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Regulierung der Morphologie, Proliferation, Motilität und des Schicksals einer Zelle. Er kontrolliert viele Ereignisse während der Embryogenese²⁰⁵, darunter die Ausbildung der Körperachsen²⁰⁶ und beeinflusst die homöostatische Erneuerung von Zellen in einer Reihe adulter Gewebe²⁰⁷. Aber auch die Tumorgenese von Zellen durch die parakrine Beeinflussung des Verhaltens von benachbarten Zellen wird vom Wnt/ β -Catenin-Signalweg mit gesteuert.²⁰⁸

Wnt-Proteine sind sezernierte Liganden der membranständigen Frizzled-Rezeptoren bzw. der LRP (*low density lipoprotein-related protein*) und umfassen nach heutigem Kenntnisstand 19 sezernierte Glykoproteine. Die Frizzled-Rezeptoren (Fz) sind membranständig mit sieben transmembranären Domänen. Der extrazelluläre Teil enthält eine cysteinreiche Domäne, die die Bindung mit Wnt vermittelt.²⁰⁹ LRPs haben nur eine transmembranäre Domäne und einen recht langen extrazellulären und kurzen zytosolischen Teil.²¹⁰

Eine zentrale Rolle im Wnt-Signalweg spielt β -Catenin. Normalerweise ist die cytoplasmatische Konzentration von freiem β -Catenin gering, denn es wird sofort durch Axin und den Tumorsuppressor APC (*adenomatosis polyposis coli*) gebunden, so dass die Casein-Kinase I (CKI) β -Catenin N-terminal am Serin 45 phosphorylieren kann.^{211;212} Dieser so genannte Destruktionskomplex aus Axin, APC und CKI lockt die Glykogen-Synthase-Kinase 3 β (GSK3 β) an, die weitere Serin- und Threoninresiduen N-terminal von Serin 45 phosphoryliert.²¹³ Das so markierte β -Catenin wird dann Ubiquitin-vermittelt abgebaut.²¹⁴

Die Aktivierung des Wnt-Signalweges wird durch Wnt-Proteine vermittelt. Diese binden an einen Rezeptorkomplex aus einem Frizzled-Rezeptor und einem LRP-Protein, wie in Abbildung 5.8 A dargestellt, und aktivieren *Dishevelled* (Dsh). Dieses wiederum schützt indirekt β -Catenin vor der Phosphorylierung durch GSK3 β und CKI und folgend vor dem Abbau.²¹⁵ So kommt es im Cytosol zu einer Anreicherung von unphosphoryliertem β -

Catenin und zu einer Verlagerung von β -Catenin in den Nukleus. Dort kann es an Mitglieder der *T-cell factor/lymphoid enhancing factor* (Tcf/Lef) binden. Diese Transkriptionsfaktoren beeinflussen die Transkription von Wnt-Zielgenen wie *c-myc*²¹⁶, *c-jun*²¹⁷, *Tcf-1*²¹⁸, *fra-1*, *CycD* etc., die den Zellzyklus kontrollieren. Eine Liste der Wnt/ β -Catenin-Zielgene ist im Internet zugänglich.²¹⁹

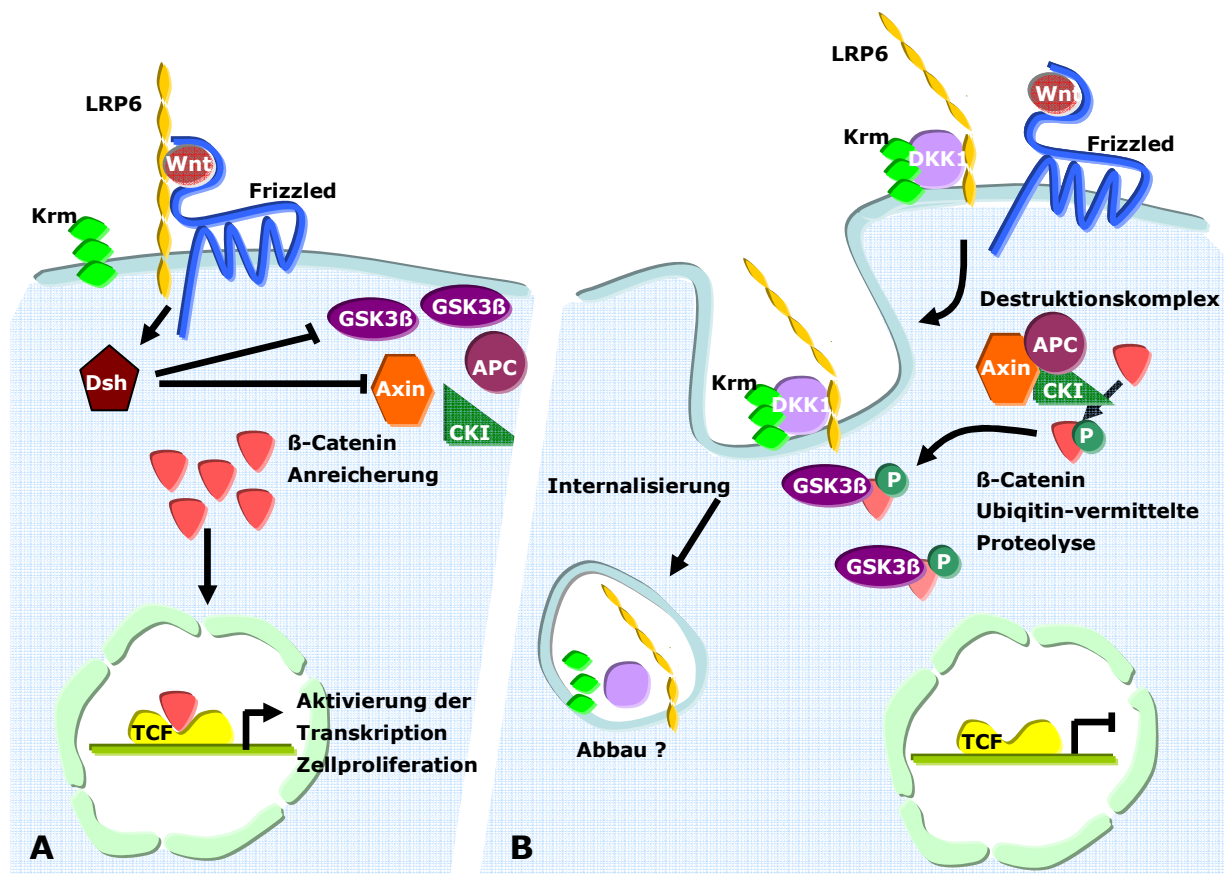


Abbildung 5.8: Wnt-Signalweg ohne DKK1 (A) bzw. in Anwesenheit von DKK1 (B). Wnt-Proteine aktivieren den Wnt-Signalweg durch Bindung an einen Rezeptorkomplex aus LRP6 und Frizzled (A). Dadurch kommt es zu einer Inhibition des Destruktionskomplexes und von GSK3 β . Die so unterbundene Phosphorylierung von β -Catenin führt zu seiner Anreicherung im Cytosol und Translokation in den Nukleus, wo es als Transkriptionsfaktor die Expression von Wnt-Zielgenen induziert. Bei Anwesenheit von DKK1 (B), einem Inhibitor des Wnt-Signalweges, kommt es zur Ausbildung eines Rezeptorkomplexes zwischen LRP6 und Kremen1/2 (Krm), der sofort internalisiert und wahrscheinlich abgebaut wird. Der Destruktionskomplex mit GSK3 β kann β -Catenin phosphorylieren und so für die Ubiquitin-vermittelte Proteolyse zugänglich machen. Eine Aktivierung der Transkription von Wnt-Zielgenen unterbleibt.

Das in dieser Arbeit weiter untersuchte Kandidatengen der SSH, DKK1, ist ein Inhibitor dieses Wnt-Signalweges.²²⁰ DKK1 bindet jedoch nicht wie Wnt-Proteine an den LRP/Frizzled-Rezeptorkomplex, sondern, wie in Abbildung 5.8 B dargestellt, an Kremen1/2 (Krm).²²¹ Kremen bildet einen ternären Komplex mit DKK1 und LRP6 und induziert die sofortige Endozytose und somit die Entfernung des Wnt-Rezeptors LRP5/6 von der Plasmamembran. So wird die Aktivierung des Wnt-Signalweges durch den LRP6/Fz-Komplex inhibiert.²²²

Der DKK1-Promotor enthält ein *p53-response*-Element, wodurch die DKK1-Expression durch Wildtyp-p53 induziert wird.¹¹⁴ Genotoxischer Stress durch UV-Strahlung und Chemotherapeutika fördert die DKK1-Expression.²²⁰ Ebenfalls ist bekannt, dass DKK1 die Zellen für die durch alkylierende Agenzien vermittelte Apoptose sensitiviert.²²⁰ Dies entspricht den Ergebnissen für beide Cal27-Zelllinien in der Expressionsstudie der 18 Zelllinien (Auswertung nach geNorm). Beide Cal27-Zelllinien reagieren mit einer Hochregulierung von DKK1 auf die Cisplatinbehandlung (siehe Abbildung 4.17 E), ebenso vier weitere Zelllinien: Hek293, MCF-7, K562 und HT29. Auf der anderen Seite gibt es aber auch drei Zelllinien (1321N1, HepG2 und 2102), die die Expression von DKK1 auf die Cisplatin-Behandlung herunterregulieren. Immerhin die Hälfte der Zelllinien zeigt keine signifikante Änderung der DKK1-Expression auf Cisplatin-Behandlung.

Dass DKK1 die Zellen für die Apoptose sensitiviert, bestätigt indirekt auch die Beobachtung, dass die sensitive Zelllinie Cal27 mehr DKK1 exprimiert als die resistente Zelllinie Cal27res. DKK1 wurde in der SSH als in der sensitiven Zelllinie Cal27 überexprimiert identifiziert. Dies konnte auch in der folgenden qRT-PCR bestätigt werden (siehe Abbildung 4.13). Bei der Genexpressionsstudie an 18 Zelllinien ist die DKK1-Überexpression der sensitiven Zelllinie nicht immer zu erkennen. Sowohl die Auswertung nach geNorm als auch nach NormIt zeigen im unbehandelten Zustand beider Zelllinien eine höhere Expression in Cal27res als in Cal27 (siehe Abbildung 4.23 A und B). Erst nach der Cisplatin-Behandlung ist die Expression von DKK1 in Cal27 größer als in Cal27res (nach NormIt, nach geNorm ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Zelllinien zu detektieren). Diese Ergebnisse sind in Abbildung 5.9 zusammenfassend dargestellt.

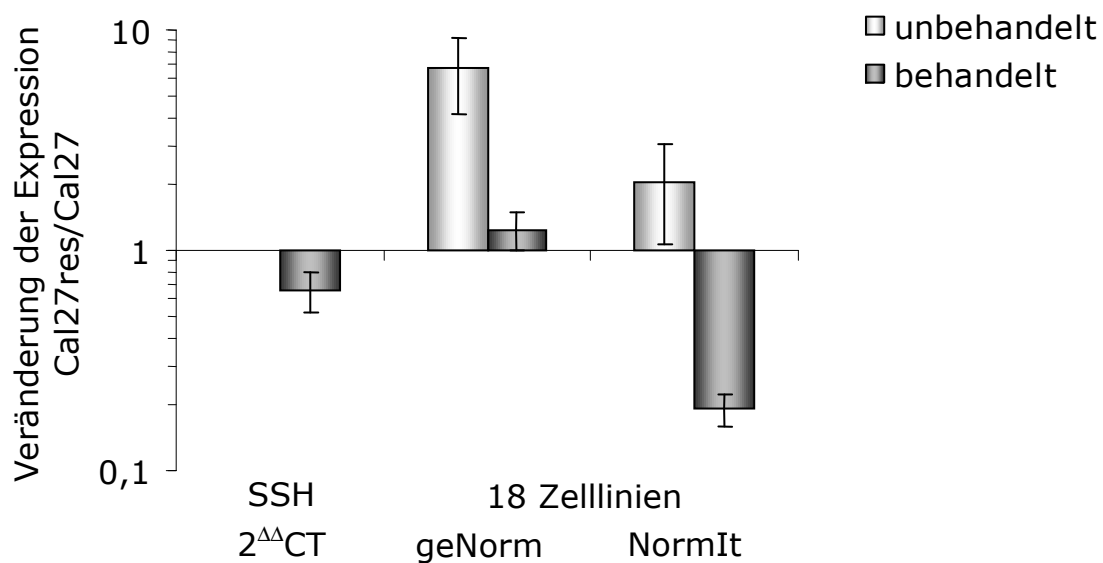


Abbildung 5.9: Vergleich der Expression von DKK1, ermittelt in der qRT-PCR-Bestätigung der SSH-Kandidatengene (ausgewertet mit der $2^{\Delta\Delta CT}$ -Methode) mit den nach geNorm und NormIt ausgewerteten Experimenten der 18-Zelllinien-Genexpressionsstudie. MW \pm SD aus $n \geq 3$.

Die durchgeführten ELISA-Messungen von DKK1 im Nährmedienüberstand der beiden Cal27-Zelllinien zeigen sehr konstant, dass Cal27 nach einer 24-stündigen Inkubation etwa 2fach mehr DKK1 im Nährmedium aufweist als Cal27res. Dies muss nicht unbedingt mit mRNA-Spiegeln von DKK1 korrelieren, da auch die Halbwertszeit oder mögliche Reifung von DKK1 durch weitere äußere Faktoren beeinflusst wird. Beim Vergleich der Basal-Expression beider Zelllinien mittels Mikroarray ergibt sich jedoch auch eine 1,61fache Überexpression von DKK1 in der sensitiven Zelllinie Cal27.

Das zweite untersuchte Zellpaar A2780/A2780cis reagiert anders als das Zellpaar Cal27/Cal27res. Weder bei der Analyse des Einflusses der Cisplatin-Behandlung (siehe Abbildung 4.24) noch des Einflusses der Resistenz (siehe Abbildung 4.25) zeigen sich nach geNorm Unterschiede zwischen A2780 und A2780cis bzw. zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. Betrachtet man die mittels NormIt korrigierten C_T -Werte (siehe Abbildung 4.18 E), kann man für beide Zelllinien eine etwa gleich

ausgeprägte Induktion der DKK1-Expression auf die Cisplatin-Behandlung beobachten.

Eine mögliche Ursache, dass die GSK3-Inhibitoren (BIO und 1-Azakenpaulon) keinen Effekt zeigen, könnten Mutationen in GSK3-Zielgenen sein. Mutationsanalysen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht. Aber auch im Wnt/ β -Catenin-Signalweg führen Mutationen von Proteinen zu veränderten Signaltransduktionen.²²³⁻²²⁸

Verschiedene Stimuli neben der Behandlung der Zellen mit Cisplatin wie Serumentzug, verbrauchtes Nährmedium und auch die Behandlung mit anderen Zytostatika führen zum Teil zu einer gesteigerten Sezernierung von DKK1. Entgegen der Beobachtung von Gregory et al., dass mesenchymale Stammzellen bei einer Kultivierung unter Serumentzug weniger DKK1 sezernieren als mit Serum kultivierte Zellen¹¹⁵, wurde in Versuchen dieser Arbeit gefunden, dass DKK1 durch Serumentzug induziert wird. Die Ursache dieser unterschiedlichen Beobachtungen könnte zum einen daran liegen, dass Gregory et al. mesenchymale Stammzellen untersucht haben und in dieser Arbeit Tumorzellen untersucht wurden. Zum anderen könnte es auf unterschiedliche Zelldichten zurückzuführen sein, da laut Gregory et al. die DKK1-Sekretion abhängig ist von der Wachstumsphase, in der sich die Zellen befinden. Ein weiterer Widerspruch findet sich, da Gregory et al.¹¹⁵ beobachteten, dass die DKK1-Sezernierung in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zur stationären Phase gesteigert ist. In den Versuchen dieser Arbeit kommt es während der exponentiellen Wachstumsphase (0 bis 72 h) zu einer geringeren DKK1-Sezernierung als nach 96 h (Konfluenz der Zellen, siehe Abbildung 4.30).

Nach Behandlung mit Cisplatin und Oxaliplatin steigt die DKK1-Sezernierung der Zellen signifikant an (siehe Abbildung 4.29 und 4.32). Die verstärkte Sezernierung nach Paclitaxel-Behandlung ist nicht signifikant. Ob diese Induktion der DKK1-Sezernierung spezifisch ist für alkylierende Zytostatika, bedarf daher weiterer Untersuchungen. Shou et al. fanden eine pro-apoptotische Wirkung von DKK1 auf Behandlung von Glioblastom-Zellen mit DNA-quervernetzenden Zytostatika, nicht jedoch bei Behandlung der Zellen mit dem Mitosegift Vincristin.²²⁰ Bei dem hier mit untersuchten Paclitaxel, das die Mikrotubuli-Depolymerisation hemmt, ist das Ausmaß

der verstärkten DKK1-Sezernierung aufgrund der großen Abweichungen der Mittelwerte nicht signifikant. Sie ist aber sowohl in der sensitiven Zelllinie Cal27 als auch in der resistenten Zelllinie Cal27res zu erkennen (siehe Abbildung 4.33).

Nach Behandlung der Zellen mit MTX kommt es nicht zu einer verstärkten DKK1-Sezernierung (siehe Abbildung 4.34). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die gesteigerte DKK1-Sezernierung spezifisch ist für alkylierende Zytostatika. Eine andere Erklärung könnte eine zu hohe MTX-Konzentration oder eine zu kurze Inkubationszeit (24 h) sein. Auch der Effekt von Cisplatin auf die Cal27-Zelllinien ist nach 48 h deutlich ausgeprägter als nach 24 h. Bei der Behandlung der Zellen mit Cisplatin ist ein Unterschied zwischen der Cisplatin-resistenten Zelllinie Cal27res und der Cisplatin-sensitiven Zelllinie Cal27 zu erkennen. Aufgrund der ermittelten Daten ist es auch möglich, dass Cal27 die DKK1-Expression schneller induzieren kann als Cal27res.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die verstärkte DKK1-Sezernierung ein unspezifisches, stressbedingtes Phänomen sein kann. Nicht nur durch Cisplatin, auch durch andere Zytostatika ebenso wie durch Serumentzug und verbrauchtes Nährmedium wird die Sekretion von DKK1 in Tumorzellen induziert. Inwieweit dies jedoch im Zusammenhang mit der Cisplatin-resistenz steht, haben weitere Versuche wie die Etablierung DKK1-überexprimierender Zellklone gezeigt.

Dazu wurde die DKK1-Sequenz in den Vektor pcDNA3.1 kloniert, mit dem beide Cal27-Zelllinien transfiziert wurden. Mit Hilfe der PCR war es möglich, die mit G418 selektierten transfizierten Klone auf der Ebene der genomischen DNA nach Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein der transfizierten Sequenz zu untersuchen. War die Plasmid-DNA nach der Selektion der Klone mit G418 in den Zellen nicht nachzuweisen, waren die Klone aufgrund der fehlenden DNA nicht in der Lage, das entsprechende Protein zu synthetisieren.

Eine Überexpression von DKK1 hat einen Einfluss auf die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber Cisplatin. Die DKK1-überexprimierenden Zelllinien Cal27-DKK1 und Cal27res-DKK1 sind beide im Vergleich zu der jeweiligen

mit Leervektor transfizierten Kontrollzelllinie (Cal27-Leer bzw. Cal27res-Leer) etwa 2fach sensitiver gegenüber Cisplatin (siehe Tabelle 4.12). Dies passt zusammen mit publizierten Vermutungen, dass DKK1 als Inhibitor des Wnt/ β -Catenin-Signalweges die Zellen für die Apoptose sensitiviert.²²⁰

Es wäre interessant, in weiteren Untersuchungen zu klären, ob die DKK1-überexprimierenden Klone neben Cisplatin auch sensitiver gegenüber anderen Stresssituationen sind. Eine gezielte Untersuchung des Einflusses anderer alkylierender Zytostatika im Vergleich zu Zytostatika mit anderen Wirkmechanismen könnte klären, ob der Effekt von DKK1 Cisplatin-spezifisch ist oder nicht. Ebenso wäre an den DKK1-überexprimierenden Klonen zu untersuchen, ob diese auch sensitiver gegenüber anderen, nicht Zytostatika-vermittelten Stresssituationen sind.

Ein weiterer Ansatzpunkt, um den Stellenwert von DKK1 bzw. des Wnt/ β -Catenin-Signalweges bei der Cisplatinresistenz von Tumorzellen zu ermitteln, wäre der *Knock Down* von DKK1, also die gezielte Herabregulierung von DKK1 in der Zelle. Dies wurde anhand einer Zielsequenz versucht, die vektorbasiert (shRNA) u. a. in die beiden Cal27-Zelllinien transfiziert wurde. In ersten Untersuchungen (qRT-PCR) zeigten sich jedoch keine Effekte, was primär auf die Zielsequenz zurückzuführen sein wird.

6 Zusammenfassung

Cisplatin ist ein zur Behandlung von vielen Tumoren eingesetztes Zytostatikum. Ein Hauptproblem bei der Chemotherapie mit Cisplatin ist die Resistenzentwicklung der Tumorzellen. Die Mechanismen dieser Cisplatin-Resistenz sind bis heute nicht umfassend aufgeklärt und diese Arbeit sollte einen Beitrag zur Aufklärung noch nicht bekannter Resistenzmechanismen leisten. Ausgehend von der Zungenkarzinom-Zelllinie Cal27 war es möglich, eine 10fach Cisplatin-resistente Subzelllinie (Cal27res) zu etablieren. Die Genexpression dieser beiden Zelllinien wurde mittels der PCR-basierten Subtraktionshybridisierung (SSH) nach einer Behandlung der Zelllinien mit 10 μM Cisplatin – maximalen Plasmaspiegeln – verglichen. Um die normalerweise recht große Anzahl falsch-positiver Ergebnisse dieser Methode zu minimieren, wurde die SSH ergänzt durch zwei weitere Methoden: *Mirror orientation selection* (MOS) und einem differentiellen Screening.

So konnten mittels SSH fünf Kandidatengene identifiziert werden, die nach Cisplatin-Behandlung unterschiedlich zwischen Cal27res und der Cal27 exprimiert wurden. Dies waren Aldo-Keto-Reduktase AKR1B1, Cystatin A (CSTA), der Wnt-Inhibitor Dickkopf 1 (DKK1), das ribosomale Protein 5 der großen Untereinheit (RPL5) und Thrombospondin-1 (THBS1). Bis auf RPL5 konnte für diese Gene die differentielle Expression mittels qRT-PCR zwischen Cal27 und Cal27res bestätigt werden. Um einen besseren Einblick zu bekommen, ob diese Gene Teil einer allgemeingültigen Reaktion von Tumorzellen auf die Behandlung mit Cisplatin sind, wurden neben den beiden Cal27-Zelllinien weitere 16 Tumorzelllinien mittels qRT-PCR untersucht. Alle Zelllinien wurden vergleichbaren Cisplatinkonzentrationen ausgesetzt, nachdem die Cisplatin-sensitivität aller Zelllinien gegenüber Cisplatin mittels MTT-Test analysiert worden war. Nach einer 24stündigen Behandlung jeder Zelllinie mit der 1-2fachen EC_{50} von Cisplatin und einer 48stündigen Auswaschphase wurde die Expression der SSH-Kandidatengene und weiterer interessanter Gene (AKR1C1/2, CTSC, EGR1 und p53) mittels qRT-PCR untersucht. Als Kontrolle wurde von jeder Zelllinie ebenfalls RNA einer unbehandelten Probe gewonnen. Um die

mittels PCR untersuchten Zelllinien untereinander vergleichen zu können, stellte sich die Frage nach einer geeigneten Normierung der qRT-PCR-Daten. Die zuvor angewendete Methode von Vandesompele et al. (Genome Biol. 2002), als geNorm publiziert, schien bei einer solch großen Datenmatrix als weniger geeignet. Alle 36 Proben, hervorgegangen aus 18 verschiedenen Zelllinien mit je zwei verschiedenen Behandlungen, hätten auf wenige, für alle Proben identische interne Standardgene (HKGs) normiert werden müssen. Generell ist jedoch das Expressionsmuster der als potentiellen HKGs eingesetzten Gene in dieser Vielzahl untersuchter Gewebe sehr verschieden. Daher wurde eine neue Methode der Auswertung (NormIt) entwickelt, die, bezogen auf das generelle Expressionsmuster der potentiellen HKGs, über alle untersuchten Proben für jede Probe geeignete HKGs auswählt. Über diese HKGs können die ursprünglich gemessenen C_T -Werte normalisiert werden. Dies erlaubt den absoluten Vergleich der Genexpressionen zwischen den Zelllinien, jedoch steht die endgültige Validierung dieses Verfahrens noch aus.

Interessante Ergebnisse zeigten sich in dieser PCR-Genexpressionsstudie vor allem für die beiden Kandidatengene THBS1 und DKK1 sowie für das Gen EGR1. THBS1 zeigt in fast allen Zelllinien eine signifikante Induktion auf Cisplatin-Behandlung, besonders in Cal27 und den beiden A2780-Zelllinien. DKK1 wird nicht einheitlich auf Cisplatin-Behandlung von den verschiedenen Zelllinien reguliert, aber vor allem Cal27 zeigt eine deutliche Induktion, Cal27res dagegen nicht. EGR1 wird vor allem von den beiden A2780-Zelllinien auf Cisplatin-Behandlung induziert, andere Zelllinien reagieren aber z. T. auch mit einer Herabregulierung.

Für den Wnt-Antagonisten DKK1 war es möglich, einen ELISA zu etablieren. Dieser zeigte für Cal27 auf Proteinebene eine etwa 2-3fach gesteigerte Sezernierung von DKK1 gegenüber der Cisplatin-resistenten Subzelllinie Cal27res. Eine stabile Überexpression von DKK1 führte zu etwa 2fach Cisplatin-sensitiveren Klonen sowohl von Cal27 als auch von Cal27res. Dies konnte mittels eines Zytotoxizitäts-Test (MTT-Test) als auch eines Proliferations-Test (BrdU-Test) gezeigt werden. Eine Behandlung der Zellen mit Cisplatin führte zu einer gesteigerten DKK1-Sekretion. Inwieweit dies jedoch Cisplatin-spezifisch ist, bedarf weiterer Untersuchungen. Weitere Stressestimuli wie Serumentzug oder auch

andere Zytostatika scheinen eine verstärkte DKK1-Sekretion hervorzurufen.

In dieser Arbeit konnten neue Kandidatengene der Cisplatin-Resistenz identifiziert und ihre Expression mittels PCR an 18 Zelllinien ohne und mit Cisplatin-Behandlung verglichen werden. DKK1 wurde weitergehender untersucht und die Ergebnisse zeigen, dass der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ein Ansatzpunkt sein könnte, um generell das Ansprechen von Tumoren auf die Behandlung mit Zytostatika zu sensitivieren.

7 Abstract

Cisplatin is used for the treatment of various types of cancer. One of the major problems in chemotherapy is the occurrence of drug resistance. Up until today, the mechanisms of resistance still aren't clearly understood. In the differential gene expression study we managed to establish an about 10-fold cisplatin resistant subcell line of 27 (Cal27res). Gene expression analysis of both cell lines by PCR-based suppression subtractive hybridization (SSH) was performed after treatment of cell lines with 10 μ M Cisplatin. This concentration corresponds to achievable plasma levels of cisplatin. A major drawback of SSH is the occurrence of false-positive results. To reduce this background, two further methods were performed: mirror orientation selection (MOS) and differential screening.

Five candidate genes could be identified by SSH which were differentially regulated between the cisplatin sensitive parental cell line Cal27 and its cisplatin resistant subcell line Cal27res. The genes identified were Aldo-keto-reductase AKR1B1, cystatin A (CSTA), the Wnt inhibitor DKK1, the ribosomal protein of large subunit 5 (RPL5) and the angiogenesis inhibitor thrombospondin-1 (THBS1). For all genes except for RPL5 the differential gene expression could be verified by qRT-PCR. Another gene expression study of Cal27 cell lines and 16 other tumour cell lines was carried out to examine whether differential gene expression of these candidate genes is part of a general reaction of cells following cisplatin treatment. Initially cisplatin sensitivity of all cell lines was examined by MTT assay. After the cell lines had been treated with cisplatin (1 to 2-fold EC_{50} for 24 h; washout 48 h) gene expression of the SSH candidate genes and some other interesting genes (AKR1C1/2, CTSB, EGR1 and p53) was analyzed by qRT-PCR. Treated cells were compared to their untreated controls.

For the comparison of gene expression between all 18 cell lines, an adequate normalization method for qRT-PCR had to be found. The method published by Vandesompele et al. (Genome Biol. 2002) seems to have disadvantages comparing such a big sample pool. All 36 samples of 18 different cell lines had to be normalized with the most stable genes from a

panel of potential housekeeping genes (HKGs). However, the examined tissues differ in the expression pattern of these genes. Thus, we established a new method (NormIt). Referring to the general expression pattern of all samples, NormIt selects adequate HKGs for each sample. Applying this method it is possible to normalize measured C_T -values for direct comparison of gene expression between different cell lines, but a validation is still missing.

The SSH candidate genes THBS1 and DKK1 and EGR1 showed interesting qRT-PCR results. THBS1 presents a significant induction of gene expression after cisplatin treatment, especially in Cal27, in A2780 and A2780cis. The expression of DKK1 after cisplatin incubation is not consistent in the different cell lines. Mainly in Cal27 its gene expression is clearly induced, but not so in Cal27res where DKK1 is not regulated. The gene expression of EGR1 is highly induced in both A2780 cell lines, whereas in some other cell lines it is down regulated. Further on an ELISA was established for the Wnt antagonist DKK1. The secretion of DKK1 in Cal27 compared to the cisplatin resistant sub cell line Cal27res was increased by 2 to 3-fold as detected on protein level. Stable overexpression of DKK1 caused a 2-fold increased sensitivity against cisplatin compared to its parent cell lines as shown by the cytotoxicity assay MTT and the proliferation assay BrdU. Treatment of Cal27 cells with cisplatin caused an induction of DKK1 secretion. It has to be further examined if this effect is cisplatin specific. First experiments hypothesized that the secretion of DKK1 is also influenced by stress stimuli such as serum starvation and incubation with different cytostatic drugs. In this study it was possible to identify new candidate genes for cisplatin resistance. Their gene expression was measured by qRT-PCR. Further investigations on DKK1 identified DKK1 to be a target to sensitize tumors to cytostatic drugs.

8 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
aa	engl. <i>amino acid</i> , Aminosäure
abs.	absolutum
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
BBS	<i>BES-buffered saline</i>
BES	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethansulfonsäure
bFGF	engl. <i>basic fibroblast growth factor</i>
BIO	(2'Z,3'E)-6-Bromindirubin-3'-oxim
BLAST	engl. <i>basic local alignment search tool</i>
Bp	Basenpaare
BrdU	5-Brom-2'-desoxyuridin
BSA	bovines Serum-Albumin
CA	Karzinom
cDNA	engl. <i>copy/coding desoxyribonucleic acid</i> , aus RNA generierte DNA
CKI	Casein-Kinase I
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CST	Cystatin
CTS	Cathepsin
d	engl. <i>day</i> , Tag
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DDB	engl. <i>DNA-damage binding protein</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMEM	engl. <i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC ₅₀	engl. <i>effective concentration</i> (EC), Konzentration einer Substanz, die in einem definierten System einen bestimmten Effekt an 50 % der Testorganismen hervorruft

EDTA	engl. <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> , Ethylendiaminessigsäure
ELISA	engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
GGR	engl. <i>global genome repair</i>
GMP	Guanosinmonophosphat
GOI	engl. <i>gene of interest</i> , zu untersuchendes Gen
GSH	Glutathion
GSK3 β	Glykogensynthase-Kinase 3 β
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HKG	engl. <i>housekeeping gene</i> , als interner Standard eingesetztes Gen
HNSCC	engl. <i>head neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	Humane Papilloma-Viren
hum.	human
IMP	Inosinmonophosphat
IC ₅₀	engl. <i>inhibitory concentration</i> (IC), inhibierende Konzentration, die eine 50%ige Inhibierung eines definierten Systems hervorruft
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
L-Gln	L-Glutamin
min	Minute
MMR	eng. <i>missmatch repair</i>
MOS	engl. <i>mirror orientation selection</i>
mRNA	engl. <i>messenger-RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NER	engl. <i>nucleotide excision repair</i>
NF	engl. <i>normalization factor</i> , Normalisierungsfaktor
NH ₄ OAc	Ammoniumacetat
NSCLC	engl. <i>non-small cell lung carcinoma</i>
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
p. a.	pro analysi
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
POD	Peroxidase
PP	Polypropylen

qRT-PCR	quantitative Reverse-Transkription Polymerase-Ketten-Reaktion
RdRP	RNA-abhängige (<i>dependent</i>) RNA-Polymerase
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase, Reverse Transkription
SCC	engl. <i>squamous-cell carcinoma</i>
SCLC	engl. <i>small cell lung carcinoma</i>
SD	engl. <i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SDS	engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SE	engl. <i>standard error</i> , Standardfehler
sec	Sekunde
SOC	engl. <i>super optimal catabolite repression medium</i>
SRB	Sulforhodamin B
SSH	Suppressive subtraktive Hybridisierung
TCA	engl. <i>trichloroacetic acid</i> , Trichloressigsäure
TCR	engl. <i>transcription-coupled repair</i>
THBS1	Thrombospondin-1
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	engl. <i>Unit</i> , Aktivitätseinheit
VEGF	engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid

9 Literaturverzeichnis

- (1) Perea-Milla LE, Minarro-Del Moral RM, Martinez-Garcia C, Zanetti R, Rosso S, Serrano S et al. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *Br J Cancer* 2003; 88(11):1702-1707.
- (2) Riedel F, Goessler U, Hormann K. Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2003; 17(4):543-555.
- (3) Viswanathan H, Wilson JA. Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2004; 29(4):295-300.
- (4) Tanabe H, Yokota K, Shibata N, Satoh T, Watari J, Kohgo Y. Alcohol consumption as a major risk factor in the development of early esophageal cancer in patients with head and neck cancer. *Intern Med* 2001; 40(8):692-696.
- (5) Maier H, Zoller J, Herrmann A, Kreiss M, Heller WD. Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1993; 108(6):655-661.
- (6) Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92(9):709-720.
- (7) Wentzensen N, von Knebel DM. [Viral carcinogenesis of head and neck tumors]. *Pathologe* 2004; 25(1):21-30.
- (8) Yang HJ, Cho YJ, Kim HS, Chang MS, Sung MW, Kim WH. Association of p53 and BCL-2 expression with Epstein-Barr virus infection in the cancers of head and neck. *Head Neck* 2001; 23(8):629-636.
- (9) Statistisches Bundesamt. Todesursachen in Deutschland 2004. Wiesbaden 2005.
- (10) Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt MK, Hölzel D. Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. In: Manual Kopf-Hals-Malignome. Wollenberg B, Zimmermann F, editors. Tumorzentrum München, 2003: 3-14.
- (11) Rosenberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in escherichia coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature* 1965; 205:698-699.
- (12) Rosenberg B, Renshaw E, Van Camp L, Hartwick J, Drobnik J. Platinum-induced filamentous growth in Escherichia coli. *J Bacteriol* 1967; 93(2):716-721.
- (13) Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum(IV) complexes. *J Biol Chem* 1967; 242(6):1347-1352.

- (14) Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE, Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222(191):385-386.
- (15) Prestayko AW, Luft FC, Einhorn L, Crooke ST. Cisplatin pharmacokinetics in a patient with renal dysfunction. *Med Pediatr Oncol* 1978; 5(1):183-188.
- (16) Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST. Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev* 1979; 6(1):17-39.
- (17) Cisplatin: an anti-tumour agent. *Drug Ther Bull* 1979; 17(25):99-100.
- (18) Jones RH, Vasey PA. Part II: testicular cancer--management of advanced disease. *Lancet Oncol* 2003; 4(12):738-747.
- (19) Devarajan P, Savoca M, Castaneda MP, Park MS, Esteban-Cruciani N, Kalinec G et al. Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: role of death receptor and mitochondrial pathways. *Hear Res* 2002; 174(1-2):45-54.
- (20) Caglar K, Kinalp C, Arpacı F, Turan M, Sağlam K, Öztürk B et al. Cumulative prior dose of cisplatin as a cause of the nephrotoxicity of high-dose chemotherapy followed by autologous stem-cell transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(11):1931-1935.
- (21) Mandić A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *J Biol Chem* 2003; 278(11):9100-9106.
- (22) Krishan A, Arya P. Monitoring of cellular resistance to cancer chemotherapy. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002; 16(2):357-72, vi.
- (23) Neue Chance mit Antikörper bei Kopf-Hals-Tumor. *Ärztezeitung* 2005.
- (24) Harari PM, Huang S. Radiation combined with EGFR signal inhibitors: head and neck cancer focus. *Semin Radiat Oncol* 2006; 16(1):38-44.
- (25) Bellon SF, Coleman JH, Lippard SJ. DNA unwinding produced by site-specific intrastrand cross-links of the antitumor drug cis-diamminedichloroplatinum(II). *Biochemistry* 1991; 30(32):8026-8035.
- (26) Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Low Extrem Wounds* 2005; 4(3):138-144.
- (27) Reed E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti- cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev* 1998; 24(5):331-344.
- (28) Wang D, Hara R, Singh G, Sancar A, Lippard SJ. Nucleotide excision repair from site-specifically platinum-modified nucleosomes. *Biochemistry* 2003; 42(22):6747-6753.
- (29) Sarker AH, Tsutakawa SE, Kostek S, Ng C, Shin DS, Peris M et al. Recognition of RNA polymerase II and transcription bubbles by XPG, CSB, and TFIIH: insights for transcription-coupled repair and Cockayne Syndrome. *Mol Cell* 2005; 20(2):187-198.

- (30) de Laat WL, Jaspers NG, Hoeijmakers JH. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 1999; 13(7):768-785.
- (31) Kobayashi T, Uchiyama M, Fukuro S, Tanaka K. Mutations in the XPD gene in xeroderma pigmentosum group D cell strains: confirmation of genotype-phenotype correlation. *Am J Med Genet* 2002; 110(3):248-252.
- (32) Ren Y, Saijo M, Nakatsu Y, Nakai H, Yamaizumi M, Tanaka K. Three novel mutations responsible for Cockayne syndrome group A. *Genes Genet Syst* 2003; 78(1):93-102.
- (33) Jiricny J. Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res* 1998; 409(3):107-121.
- (34) Buermeier AB, Deschenes SM, Baker SM, Liskay RM. Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 1999; 33:533-564.
- (35) Marti TM, Kunz C, Fleck O. DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* 2002; 191(1):28-41.
- (36) Lee SD, Alani E. Analysis of interactions between mismatch repair initiation factors and the replication processivity factor PCNA. *J Mol Biol* 2006; 355(2):175-184.
- (37) Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2003; 3(4):377-386.
- (38) Holzer AK, Samimi G, Katano K, Naerdemann W, Lin X, Safaei R et al. The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Mol Pharmacol* 2004; 66(4):817-823.
- (39) Samimi G, Katano K, Holzer AK, Safaei R, Howell SB. Modulation of the cellular pharmacology of cisplatin and its analogs by the copper exporters ATP7A and ATP7B. *Mol Pharmacol* 2004; 66(1):25-32.
- (40) Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47):7265-7279.
- (41) Gottesman MM, Pastan I. The multidrug transporter, a double-edged sword. *J Biol Chem* 1988; 263(25):12163-12166.
- (42) Kartalou M, Samson LD, Essigmann JM. Cisplatin adducts inhibit 1,N(6)-ethenoadenine repair by interacting with the human 3-methyladenine DNA glycosylase. *Biochemistry* 2000; 39(27):8032-8038.
- (43) Kartalou M, Essigmann JM. Recognition of cisplatin adducts by cellular proteins. *Mutat Res* 2001; 478(1-2):1-21.
- (44) Li Q, Yu JJ, Mu C, Yunmbam MK, Slavsky D, Cross CL et al. Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* 2000; 20(2A):645-652.

- (45) Dabholkar M, Vionnet J, Bostick-Bruton F, Yu JJ, Reed E. Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy. *J Clin Invest* 1994; 94(2):703-708.
- (46) Cummings M, Higginbottom K, McGurk CJ, Wong OG, Koberle B, Oliver RT et al. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol* 2006; 72(2):166-175.
- (47) Stojic L, Brun R, Jiricny J. Mismatch repair and DNA damage signalling. *DNA Repair (Amst)* 2004; 3(8-9):1091-1101.
- (48) Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR et al. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 1995; 55(17):3721-3725.
- (49) Chen J, Sadowski I. Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(13):4813-4818.
- (50) Lin X, Ramamurthi K, Mishima M, Kondo A, Howell SB. p53 interacts with the DNA mismatch repair system to modulate the cytotoxicity and mutagenicity of hydrogen peroxide. *Mol Pharmacol* 2000; 58(6):1222-1229.
- (51) Vikhanskaya F, Colella G, Valenti M, Parodi S, D'Incalci M, Broggin M. Cooperation between p53 and hMLH1 in a human col carcinoma cell line in response to DNA damage. *Clin Cancer Res* 1999; 5(4):937-941.
- (52) Wozniak K, Blasiak J. Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts. *Acta Biochim Pol* 2002; 49(3):583-596.
- (53) Arioka H, Nishio K, Ishida T, Fukumoto H, Fukuoka K, Nomoto T et al. Enhancement of cisplatin sensitivity in high mobility group 2 cDNA-transfected human lung cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90(1):108-115.
- (54) Perez RP. Cellular and molecular determinants of cisplatin resistance. *Eur J Cancer* 1998; 34(10):1535-1542.
- (55) Zamble DB, Mikata Y, Eng CH, Sandman KE, Lippard SJ. Testis-specific HMG-domain protein alters the responses of cells to cisplatin. *J Inorg Biochem* 2002; 91(3):451-462.
- (56) Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409(6822):860-921.
- (57) Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG et al. The sequence of the human genome. *Science* 2001; 291(5507):1304-1351.
- (58) Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270(5235):484-487.
- (59) Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, Vogelstein J, Basrai MA, Bassett DE, Jr. et al. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 1997; 88(2):243-251.

- (60) Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol* 1999; 303:349-380.
- (61) Hamilton TC, Young RC, Ozols RF. Experimental model systems of ovarian cancer: applications to the design and evaluation of new treatment approaches. *Semin Oncol* 1984; 11(3):285-298.
- (62) Fogh J, Wright WC, Loveless JD. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* 1977; 58(2):209-214.
- (63) Gioanni J, Fischel JL, Lambert JC, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E et al. Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988; 24(9):1445-1455.
- (64) Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 1978; 21(3):274-281.
- (65) Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36(1):59-74.
- (66) Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 1979; 282(5739):615-616.
- (67) Vogh J, Trempe G. New human tumor cell lines. In: *Human Tumor Cells in Vitro*. Fogh J, editor. New York: Plenum Press, 1975: 115-159.
- (68) Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 1975; 45(3):321-334.
- (69) Shimada Y, Imamura M, Wagata T, Yamaguchi N, Tobe T. Characterization of 21 newly established esophageal cancer cell lines. *Cancer* 1992; 69(2):277-284.
- (70) Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51(5):1409-1416.
- (71) Bubenik J, Perlmann P, Helmstein K, Moberger G. Cellular and humoral immune responses to human urinary bladder carcinomas. *Int J Cancer* 1970; 5(3):310-319.
- (72) Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17(5):565-577.
- (73) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1-2):55-63.

- (74) Mueller H, Kassack MU, Wiese M. Comparison of the usefulness of the MTT, ATP, and calcein assays to predict the potency of cytotoxic agents in various human cancer cell lines. *J Biomol Screen* 2004; 9(6):506-515.
- (75) Shekan P, Storeng R, Scudiero D, Monks J, Vistica D, Warren JT et al. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *J Ntl Cancer Inst* 1990; 82:1107-1112.
- (76) Rubinstein LV, Shoemaker RH, Paull KD, Simon RM, Tosini S, Skehan P et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82(13):1113-1118.
- (77) Gratzner HG. Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 1982; 218(4571):474-475.
- (78) Zisowsky J, Koegel S, Leyers S, Devarakonda K, Kassack MU, Osmak M et al. Relevance of drug uptake and efflux for cisplatin sensitivity of tumor cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 73(2):298-307.
- (79) Fedorcsak I, Ehrenberg L. Effects of diethyl pyrocarbonate and methyl methanesulfonate on nucleic acids and nucleases. *Acta Chem Scand* 1966; 20(1):107-112.
- (80) Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 2000; 132:365-386.
- (81) Glare EM, Divjak M, Bailey MJ, Walters EH. beta-Actin and GAPDH housekeeping gene expression in asthmatic airways is variable and not suitable for normalising mRNA levels. *Thorax* 2002; 57(9):765-770.
- (82) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3(7):RESEARCH0034.
- (83) Manual: Primer Assays for housekeeping genes, Qiagen. 2006.
- (84) Folgueira MA, Brentani H, Katayama ML, Patrao DF, Carraro DM, Mourao NM et al. Gene expression profiling of clinical stages II and III breast cancer. *Braz J Med Biol Res* 2006; 39(8):1101-1113.
- (85) Nakamura M, Morimoto S, Yang Q, Hisamatsu T, Hanai N, Nakamura Y et al. Osteoclast-like cells express receptor activity modifying protein 2: application of laser capture microdissection. *J Mol Endocrinol* 2005; 34(1):257-261.
- (86) Selvey S, Thompson EW, Matthaei K, Lea RA, Irving MG, Griffiths LR. Beta-actin - an unsuitable internal control for RT-PCR. *Mol Cell Probes* 2001; 15(5):307-311.
- (87) Mogal A, Abdulkadir SA. Effects of Histone Deacetylase Inhibitor (HDACi); Trichostatin-A (TSA) on the expression of housekeeping genes. *Mol Cell Probes* 2006; 20(2):81-86.

- (88) Degan M, Mazzocco FT, Di Francia R, Rossi FM, Pinto A, Gattei V. Normalizing complementary DNA by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction of beta2-microglobulin: molecular monitoring of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia. *Diagn Mol Pathol* 2000; 9(2):98-109.
- (89) Schmittgen TD, Zakrajsek BA. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. *J Biochem Biophys Methods* 2000; 46(1-2):69-81.
- (90) Manual: Roche Lightcycler h_Housekeeping Gene Selection Set, Roche Applied Science, Cat. No. 01 310 159 001. 2006.
- (91) Liu DW, Chen ST, Liu HP. Choice of endogenous control for gene expression in nonsmall cell lung cancer. *Eur Respir J* 2005; 26(6):1002-1008.
- (92) Birkenmeier EH, Davisson MT, Beamer WG, Ganschow RE, Vogler CA, Gwynn B et al. Murine mucopolysaccharidosis type VII. Characterization of a mouse with beta-glucuronidase deficiency. *J Clin Invest* 1989; 83(4):1258-1266.
- (93) Dheda K, Huggett JF, Bustin SA, Johnson MA, Rook G, Zumla A. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Biotechniques* 2004; 37(1):112-119.
- (94) Ejleskar K, Krona C, Caren H, Zaibak F, Li L, Martinsson T et al. Introduction of in vitro transcribed ENO1 mRNA into neuroblastoma cells induces cell death. *BMC Cancer* 2005; 5:161.
- (95) Salerno C, Giacomello A. Human hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. IMP-GMP exchange stoichiometry and steady state kinetics of the reaction. *J Biol Chem* 1979; 254(20):10232-10236.
- (96) Kang W, Nielsen O, Fenger C, Leslie G, Holmskov U, Reid KB. Induction of DMBT1 expression by reduced ERK activity during a gastric mucosa differentiation-like process and its association with human gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26(6):1129-1137.
- (97) Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; 25(4):402-408.
- (98) Nagai N, Kinoshita M, Ogata H, Tsujino D, Wada Y, Someya K et al. Relationship between pharmacokinetics of unchanged cisplatin and nephrotoxicity after intravenous infusions of cisplatin to cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 39(1-2):131-137.
- (99) Johnsson A, Hoglund P, Grubb A, Cavallin-Stahl E. Cisplatin pharmacokinetics and pharmacodynamics in patients with squamous-cell carcinoma of the head/neck or esophagus. *Cancer Chemother Pharmacol* 1996; 39(1-2):25-33.
- (100) Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS, Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(20):E90.

- (101) Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; 25(17):3389-3402.
- (102) Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res* 1987; 15(20):8125-8148.
- (103) Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76(2):615-619.
- (104) Wilson SP, Smith LA. Addition of glycerol during DNA exposure enhances calcium phosphate transfection. *Anal Biochem* 1997; 246(1):148-150.
- (105) Strain AJ, Wyllie AH. The uptake and stability of simian-virus-40 DNA after calcium phosphate transfection of CV-1 cells. *Biochem J* 1984; 218(2):475-482.
- (106) Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, Midoux P. Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. *Exp Cell Res* 1996; 225(1):186-194.
- (107) Derory J, Leger P, Garcia V, Schaeffer J, Hauser MT, Salin F et al. Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytol* 2006; 170(4):723-738.
- (108) Rottiers P, Desmedt M, Doms H, Contreras R, Grooten J. Tumoral environment triggers transcript anomalies in established tumors: induction of altered gene expression and of aberrant, truncated and B2 repeat-containing gene transcripts. *Neoplasia* 1999; 1(6):557-567.
- (109) Sun XJ, Sun KL, Zheng ZH, Fu WN, Hao DM, Xu HM et al. Gene expression patterns in gastric cancer. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 2006; 23(2):142-146.
- (110) Hsu NY, Ho HC, Chow KC, Lin TY, Shih CS, Wang LS et al. Overexpression of dihydrodiol dehydrogenase as a prognostic marker of non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2001; 61(6):2727-2731.
- (111) Deng HB, Adikari M, Parekh HK, Simpkins H. Ubiquitous induction of resistance to platinum drugs in human ovarian, cervical, germ-cell and lung carcinoma tumor cells overexpressing isoforms 1 and 2 of dihydrodiol dehydrogenase. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 54(4):301-307.
- (112) Baron V, Adamson ED, Calogero A, Ragona G, Mercola D. The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther* 2006; 13(2):115-124.
- (113) Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 2002; 14(1):86-91.
- (114) Wang J, Shou J, Chen X. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. *Oncogene* 2000; 19(14):1843-1848.

- (115) Gregory CA, Singh H, Perry AS, Prockop DJ. The Wnt signaling inhibitor dickkopf-1 is required for reentry into the cell cycle of human adult stem cells from bone marrow. *J Biol Chem* 2003; 278(30):28067-28078.
- (116) Walker MC, Povey S, Parrington JM, Riddle PN, Knuechel R, Masters JR. Development and characterization of cisplatin-resistant human testicular and bladder tumour cell lines. *Eur J Cancer* 1990; 26(6):742-747.
- (117) Perego P, Romanelli S, Carenini N, Magnani I, Leone R, Bonetti A et al. Ovarian cancer cisplatin-resistant cell lines: multiple changes including collateral sensitivity to Taxol. *Ann Oncol* 1998; 9(4):423-430.
- (118) Nitta A, Chung YS, Nakata B, Yashiro M, Onoda N, Maeda K et al. Establishment of a cisplatin-resistant gastric carcinoma cell line OCUM-2M/DDP. *Cancer Chemother Pharmacol* 1997; 40(1):94-97.
- (119) Zhang P, Zhang Z, Zhou X, Qiu W, Chen F, Chen W. Identification of genes associated with cisplatin resistance in human oral squamous cell carcinoma cell line. *BMC Cancer* 2006; 6:224.
- (120) Hong JH, Lee E, Hong J, Shin YJ, Ahn H. Antisense Bcl2 oligonucleotide in cisplatin-resistant bladder cancer cell lines. *BJU Int* 2002; 90(1):113-117.
- (121) Mese H, Sasaki A, Alcalde RE, Nakayama S, Matsumura T. Establishment and characterization of cisplatin-resistant human epidermoid carcinoma cell line, A431 cell. *Chemotherapy* 1998; 44(6):414-420.
- (122) Moritaka T, Kiura K, Ueoka H, Tabata M, Segawa Y, Shibayama T et al. Cisplatin-resistant human small cell lung cancer cell line shows collateral sensitivity to vinca alkaloids. *Anticancer Res* 1998; 18(2A):927-933.
- (123) Stratenschulte CE. Untersuchungen zum Beitrag von Kupfertransportern bei der Resistenz von Tumorzellen gegen Platinkomplexe. Diplomarbeit Universität Bonn. 2005.
- (124) Dardousis K, Voolstra C, Roengvoraphoj M, Sekandarzad A, Mesghenna S, Winkler J et al. Identification of Differentially Expressed Genes Involved in the Formation of Multicellular Tumor Spheroids by HT-29 Colon Carcinoma Cells. *Mol Ther* 2007; 15(1):94-102.
- (125) Lefrancois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D et al. Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89(6):3010-3019.
- (126) Maser E, Breyer-Paff U. Competing roles of reductases in the detoxification of the tobacco-specific nitrosamine ketone NNK. In: Aldo-keto reductases and toxicant metabolism. Penning TM, Petrash JM, editors. Washington (DC): American Chemical Society, 2004: 67-82.
- (127) Penning TM, Burczynski ME, Hung CF, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem Res Toxicol* 1999; 12(1):1-18.

- (128) Chen G, Geng J, Zhang YF. [Mechanism of inhibiting the proliferation of prostate cancer by finasteride: a study using cDNA microarray]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2005; 85(21):1489-1492.
- (129) Ramana KV, Friedrich B, Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *FASEB J* 2003; 17(2):315-317.
- (130) Dan S, Shirakawa M, Mukai Y, Yoshida Y, Yamazaki K, Kawaguchi T et al. Identification of candidate predictive markers of anticancer drug sensitivity using a panel of human cancer cell lines. *Cancer Sci* 2003; 94(12):1074-1082.
- (131) Fukumoto S, Yamauchi N, Moriguchi H, Hippo Y, Watanabe A, Shibahara J et al. Overexpression of the aldo-keto reductase family protein AKR1B10 is highly correlated with smokers' non-small cell lung carcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5):1776-1785.
- (132) Penning TM. AKR1B10: a new diagnostic marker of non-small cell lung carcinoma in smokers. *Clin Cancer Res* 2005; 11(5):1687-1690.
- (133) Deng HB, Parekh HK, Chow KC, Simpkins H. Increased expression of dihydrodiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem* 2002; 277(17):15035-15043.
- (134) Roberts R. Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins. *Drug News Perspect* 2005; 18(10):605-614.
- (135) Meier C, Meinhardt U, Greenfield JR, De Winter J, Nguyen TV, Dunstan CR et al. Serum cathepsin K concentrations reflect osteoclastic activity in women with postmenopausal osteoporosis and patients with Paget's disease. *Clin Lab* 2006; 52(1-2):1-10.
- (136) Beers C, Burich A, Kleijmeer MJ, Griffith JM, Wong P, Rudensky AY. Cathepsin S controls MHC class II-mediated antigen presentation by epithelial cells in vivo. *J Immunol* 2005; 174(3):1205-1212.
- (137) Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M et al. Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* 2001; 153(5):999-1010.
- (138) Lah TT, Duran Alonso MB, Van Noorden CJ. Antiprotease therapy in cancer: hot or not? *Expert Opin Biol Ther* 2006; 6(3):257-279.
- (139) Kuopio T, Kankaanranta A, Jalava P, Kronqvist P, Kotkansalo T, Weber E et al. Cysteine proteinase inhibitor cystatin A in breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58(3):432-436.
- (140) Muntener K, Zwicky R, Csucs G, Rohrer J, Baici A. Exon skipping of cathepsin B: mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death. *J Biol Chem* 2004; 279(39):41012-41017.
- (141) Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(1):192-197.

- (142) Berquin IM, Sloane BF. Cathepsin B expression in human tumors. *Adv Exp Med Biol* 1996; 389:281-294.
- (143) Gong Q, Chan SJ, Bajkowski AS, Steiner DF, Frankfater A. Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol* 1993; 12(4):299-309.
- (144) Stommel JM, Marchenko ND, Jimenez GS, Moll UM, Hope TJ, Wahl GM. A leucine-rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking. *EMBO J* 1999; 18(6):1660-1672.
- (145) Kadenbach B, Arnold S, Lee I, Huttemann M. The possible role of cytochrome c oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1655(1-3):400-408.
- (146) Hernandez-Boussard TM, Hainaut P. A specific spectrum of p53 mutations in lung cancer from smokers: review of mutations compiled in the IARC p53 database. *Environ Health Perspect* 1998; 106(7):385-391.
- (147) Ozturk M. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. *Lancet* 1991; 338(8779):1356-1359.
- (148) Li J, Wood 3rd WH, Becker KG, Weeraratna AT, Morin PJ. Gene expression response to cisplatin treatment in drug-sensitive and drug-resistant ovarian cancer cells. *Oncogene* 2006; Epub ahead of print.
- (149) Adams JC. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(6):861-865.
- (150) Rodriguez-Manzaneque JC, Lane TF, Ortega MA, Hynes RO, Lawler J, Iruela-Arispe ML. Thrombospondin-1 suppresses spontaneous tumor growth and inhibits activation of matrix metalloproteinase-9 and mobilization of vascular endothelial growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(22):12485-12490.
- (151) Huang Z, Bao SD. Roles of main pro- and anti-angiogenic factors in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10(4):463-470.
- (152) Hoekstra R, de Vos FY, Eskens FA, Gietema JA, van der GA, Groen HJ et al. Phase I safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic study of the thrombospondin-1-mimetic angiogenesis inhibitor ABT-510 in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23(22):5188-5197.
- (153) Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 2006; 28(11):1779-1802.
- (154) Gridelli C, Rossi A, Maione P. New antiangiogenetic agents and non-small cell lung cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 60(1):76-86.
- (155) Parikh DA, Ganapati R, Revankar CR. Thalidomide in leprosy--study of 94 cases. *Indian J Lepr* 1986; 58(4):560-566.
- (156) Kumar S, Witzig TE, Rajkumar SV. Thalidomid: current role in the treatment of non-plasma cell malignancies. *J Clin Oncol* 2004; 22(12):2477-2488.

- (157) Teo SK. Properties of thalidomide and its analogues: implications for anticancer therapy. *AAPS J* 2005; 7(1):E14-E19.
- (158) Ren B, Yee KO, Lawler J, Khosravi-Far R. Regulation of tumor angiogenesis by thrombospondin-1. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1765(2):178-188.
- (159) Grant SW, Kyshtoobayeva AS, Kurosaki T, Jakowatz J, Fruehauf JP. Mutant p53 correlates with reduced expression of thrombospondin-1, increased angiogenesis, and metastatic progression in melanoma. *Cancer Detect Prev* 1998; 22(3):185-194.
- (160) Nor JE, Mitra RS, Sutorik MM, Mooney DJ, Castle VP, Polverini PJ. Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res* 2000; 37(3):209-218.
- (161) Poon RT, Chung KK, Cheung ST, Lau CP, Tong SW, Leung KL et al. Clinical significance of thrombospondin 1 expression in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(12 Pt 1):4150-4157.
- (162) Greenaway J, Lawler J, Moorehead R, Bornstein P, Lamarre J, Petrik J. Thrombospondin-1 inhibits VEGF levels in the ovary directly by binding and internalization via the low density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1). *J Cell Physiol* 2007; 210(3):807-818.
- (163) Bastian M, Steiner M, Schuff-Werner P. Expression of thrombospondin-1 in prostate-derived cell lines. *Int J Mol Med* 2005; 15(1):49-56.
- (164) Taraboletti G, Morbidelli L, Donnini S, Parenti A, Granger HJ, Giavazzi R et al. The heparin binding 25 kDa fragment of thrombospondin-1 promotes angiogenesis and modulates gelatinase and TIMP-2 production in endothelial cells. *FASEB J* 2000; 14(12):1674-1676.
- (165) Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM et al. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* 2002; 8(4):349-357.
- (166) Li Z, Calzada MJ, Sipes JM, Cashel JA, Kruttsch HC, Annis DS et al. Interactions of thrombospondins with alpha4beta1 integrin and CD47 differentially modulate T cell behavior. *J Cell Biol* 2002; 157(3):509-519.
- (167) Aloni R, Peleg D, Meyuhas O. Selective translational control and nonspecific posttranscriptional regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver. *Mol Cell Biol* 1992; 12(5):2203-2212.
- (168) Shama S, Avni D, Frederickson RM, Sonenberg N, Meyuhas O. Overexpression of initiation factor eIF-4E does not relieve the translational repression of ribosomal protein mRNAs in quiescent cells. *Gene Expr* 1995; 4(4-5):241-252.
- (169) Kim SH, Lee JY, Kim J. Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328(4):962-967.

- (170) Toshimitsu H, Hashimoto K, Tangoku A, Iizuka N, Yamamoto K, Kawauchi S et al. Molecular signature linked to acquired resistance to cisplatin in esophageal cancer cells. *Cancer Lett* 2004; 211(1):69-78.
- (171) Whiteside MA, Chen DT, Desmond RA, Abdulkadir SA, Johanning GL. A novel time-course cDNA microarray analysis method identifies genes associated with the development of cisplatin resistance. *Oncogene* 2004; 23(3):744-752.
- (172) Shi Y, Zhai H, Wang X, Han Z, Liu C, Lan M et al. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 2004; 296(2):337-346.
- (173) Johnsson A, Zeelenberg I, Min Y, Hilinski J, Berry C, Howell SB et al. Identification of genes differentially expressed in association with acquired cisplatin resistance. *Br J Cancer* 2000; 83(8):1047-1054.
- (174) Guerra B, Issinger OG. p53 and the ribosomal protein L5 participate in high molecular mass complex formation with protein kinase CK2 in murine teratocarcinoma cell line F9 after serum stimulation and cisplatin treatment. *FEBS Lett* 1998; 434(1-2):115-120.
- (175) Du J, Shi Y, Pan Y, Jin X, Liu C, Liu N et al. Regulation of multidrug resistance by ribosomal protein l6 in gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(2):242-247.
- (176) Lee SK, Kim SB, Kim JS, Moon CH, Han MS, Lee BJ et al. Butyrate response factor 1 enhances cisplatin sensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 2005; 117(1):32-40.
- (177) Shen DW, Liang XJ, Suzuki T, Gottesman MM. Identification by functional cloning from a retroviral cDNA library of cDNAs for ribosomal protein L36 and the 10-kDa heat shock protein that confer cisplatin resistance. *Mol Pharmacol* 2006; 69(4):1383-1388.
- (178) Kasai H, Nadano D, Hidaka E, Higuchi K, Kawakubo M, Sato TA et al. Differential expression of ribosomal proteins in human normal and neoplastic colorectum. *J Histochem Cytochem* 2003; 51(5):567-574.
- (179) Bee A, Ke Y, Forootan S, Lin K, Beesley C, Forrest SE et al. Ribosomal protein l19 is a prognostic marker for human prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(7 Pt 1):2061-2065.
- (180) Cheng Q, Lau WM, Tay SK, Chew SH, Ho TH, Hui KM. Identification and characterization of genes involved in the carcinogenesis of human squamous cell cervical carcinoma. *Int J Cancer* 2002; 98(3):419-426.
- (181) Goldstone SD, Lavin MF. Isolation of a cDNA clone, encoding the ribosomal protein S20, downregulated during the onset of apoptosis in a human leukaemic cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196(2):619-623.
- (182) Lin CH, Palma JF, Solomon WB. Phorbol ester induction of differentiation and apoptosis in the K562 cell line is accompanied by marked decreases in the stability of globin mRNAs and decreases in the steady state level of mRNAs encoding for ribosomal proteins L35, L31, L27, and L21. *Cell Mol Biol Res* 1994; 40(1):13-26.

- (183) Chen FW, Ioannou YA. Ribosomal proteins in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol* 1999; 18(5-6):429-448.
- (184) Hu ZB, Minden MD, McCulloch EA, Stahl J. Regulation of drug sensitivity by ribosomal protein S3a. *Blood* 2000; 95(3):1047-1055.
- (185) Naora H, Takai I, Adachi M, Naora H. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induces apoptosis. *J Cell Biol* 1998; 141(3):741-753.
- (186) Chen FW, Davies JP, Ioannou YA. Differential gene expression in apoptosis: identification of ribosomal protein 23K, a cell proliferation inhibitor. *Mol Genet Metab* 1998; 64(4):271-282.
- (187) Khanna N, Reddy VG, Tuteja N, Singh N. Differential gene expression in apoptosis: identification of ribosomal protein S29 as an apoptotic inducer. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 277(2):476-486.
- (188) Jang CY, Lee JY, Kim J. RpS3, a DNA repair endonuclease and ribosomal protein, is involved in apoptosis. *FEBS Lett* 2004; 560(1-3):81-85.
- (189) Dai MS, Shi D, Jin Y, Sun XX, Zhang Y, Grossman SR et al. Regulation of the MDM2-p53 pathway by ribosomal protein L11 involves a post-ubiquitination mechanism. *J Biol Chem* 2006.
- (190) Jin A, Itahana K, O'Keefe K, Zhang Y. Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol* 2004; 24(17):7669-7680.
- (191) Dai MS, Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem* 2004; 279(43):44475-44482.
- (192) Hjoberg J, Le L, Imrich A, Subramaniam V, Mathew SI, Vallone J et al. Induction of early growth-response factor 1 by platelet-derived growth factor in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286(4):L817-L825.
- (193) Grimbacher B, Aicher WK, Peter HH, Eibel H. TNF-alpha induces the transcription factor Egr-1, pro-inflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells. *Rheumatol Int* 1998; 17(5):185-192.
- (194) Russell DL, Doyle KM, Gonzales-Robayna I, Pipaon C, Richards JS. Egr-1 induction in rat granulosa cells by follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone: combinatorial regulation by transcription factors cyclic adenosine 3',5'-monophosphate regulatory element binding protein, serum response factor, sp1, and early growth response factor-1. *Mol Endocrinol* 2003; 17(4):520-533.
- (195) Dieckgraefe BK, Weems DM. Epithelial injury induces egr-1 and fos expression by a pathway involving protein kinase C and ERK. *Am J Physiol* 1999; 276(2 Pt 1):G322-G330.

- (196) Wang WD, Li R, Chen ZT, Li DZ, Duan YZ, Cao ZH. Cisplatin-controlled p53 gene therapy for human non-small cell lung cancer xenografts in athymic nude mice via the CArG elements. *Cancer Sci* 2005; 96(10):706-712.
- (197) Gashler A, Sukhatme VP. Early growth response protein 1 (Egr-1): prototype of a zinc-finger family of transcription factors. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1995; 50:191-224.
- (198) Huang RP, Fan Y, de B, I, Niemeyer C, Gottardis MM, Mercola D et al. Decreased Egr-1 expression in human, mouse and rat mammary cells and tissues correlates with tumor formation. *Int J Cancer* 1997; 72(1):102-109.
- (199) Liu C, Rangnekar VM, Adamson E, Mercola D. Suppression of growth and transformation and induction of apoptosis by EGR-1. *Cancer Gene Ther* 1998; 5(1):3-28.
- (200) Liu C, Yao J, de B, I, Huang RP, Adamson E, Mercola D. The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-beta1, fibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1. *J Biol Chem* 1999; 274(7):4400-4411.
- (201) de B, I, Huang RP, Fan Y, Liu C, Mercola D, Adamson ED. p53 and Egr-1 additively suppress transformed growth in HT1080 cells but Egr-1 counteracts p53-dependent apoptosis. *Oncogene* 1999; 18(24):3633-3642.
- (202) Adamson ED, Mercola D. Egr1 transcription factor: multiple roles in prostate tumor cell growth and survival. *Tumour Biol* 2002; 23(2):93-102.
- (203) Lucerna M, Pomyje J, Mechtcheriakova D, Kadl A, Gruber F, Bilban M et al. Sustained expression of early growth response protein-1 blocks angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 2006; 66(13):6708-6713.
- (204) Weisz L, Zalcenstein A, Stambolsky P, Cohen Y, Goldfinger N, Oren M et al. Transactivation of the EGR1 gene contributes to mutant p53 gain of function. *Cancer Res* 2004; 64(22):8318-8327.
- (205) Willert K, Jones KA. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev* 2006; 20(11):1394-1404.
- (206) Karner C, Wharton KA, Carroll TJ. Apical-basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 2006; 17(2):214-222.
- (207) Clevers H. Wnt/beta-Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 2006; 127(3):469-480.
- (208) Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20:781-810.
- (209) Wu CH, Nusse R. Ligand receptor interactions in the Wnt signaling pathway in *Drosophila*. *J Biol Chem* 2002; 277(44):41762-41769.
- (210) He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 2004; 131(8):1663-1677.

- (211) Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben Shushan E, Mann M et al. Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 2002; 16(9):1066-1076.
- (212) Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 2002; 108(6):837-847.
- (213) Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996; 272(5264):1023-1026.
- (214) Zellmer S, Schmidt-Heck F, Gaunitz F, Baldysaik-Figiel A, Guthke R, Gebhardt R. Dynamic Network Reconstruction from Gene Expression Data Describing the Effect of LiCl Stimulation on Hepatocytes. *Journal of Integrative Bioinformatics* 2005; 0015.
- (215) Li L, Yuan H, Weaver CD, Mao J, Farr GH, III, Sussman DJ et al. Axin and Frat1 interact with dvl and GSK, bridging Dvl to GSK in Wnt-mediated regulation of LEF-1. *EMBO J* 1999; 18(15):4233-4240.
- (216) He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281(5382):1509-1512.
- (217) Mann B, Gelos M, Siedow A, Hanski ML, Gratchev A, Ilyas M et al. Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(4):1603-1608.
- (218) Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der HK, Goldschmeding R et al. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 1999; 285(5435):1923-1926.
- (219) Nusse R. Target genes of Wnt/b-catenin signaling. In: *The Wnt Homepage* (1996-2006): <http://www.stanford.edu/~rnusse/pathways/targets.html>. 22.01.2007.
- (220) Shou J, Ali-Osman F, Multani AS, Pathak S, Fedi P, Srivenugopal KS. Human Dkk-1, a gene encoding a Wnt antagonist, responds to DNA damage and its overexpression sensitizes brain tumor cells to apoptosis following alkylation damage of DNA. *Oncogene* 2002; 21(6):878-889.
- (221) Niehrs C. Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. *Oncogene* 2006; 25(57):7469-7481.
- (222) Mao B, Wu W, Davidson G, Marhold J, Li M, Mechler BM et al. Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* 2002; 417(6889):664-667.
- (223) You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL et al. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol* 2002; 157(3):429-440.

- (224) Nusse R. Wnt signaling in disease and in development. *Cell Res* 2005; 15(1):28-32.
- (225) Rubinfeld B, Robbins P, El Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 1997; 275(5307):1790-1792.
- (226) Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87(2):159-170.
- (227) Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S et al. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 1999; 13(10):1309-1321.
- (228) Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58(6):1130-1134.

10 Veröffentlichungen

Extended Abstracts

Gosepath, E.M.; Weykam, S.; Gruenewald ,E.; Ko, Y.; Wiese, M.; Kassack, M.U.: Differential gene expression studies in cisplatin-sensitive versus cisplatin-resistant human cancer cell lines. Int J Clin Pharmacol Ther. 2004 Nov;42(11):637-9.

Gosepath, E.M.; Weykam, S.; Wiese, M.; Kassack, M.U.: Identification of new genes involved in cisplatin resistance and their expression profile in 18 human tumor cell lines. Int J Clin Pharmacol Ther. 2005 Dec;43(12):579-80.

Posterpräsentationen

Gosepath, E.M.; Jaehde, U.; Wiese, M.; Ko, Y.; Kassack, M.U.: Comparison of gene expression in a cisplatin-resistant with its parental cisplatin-sensitive testicular cancer cell line by suppression subtractive hybridisation. Jahrestagung der DPhG, Berlin, 09. - 12. Oktober 2002

Gosepath, E.M.; Gruenewald, E.; Ko, Y.; Wiese, M.; Kassack, M.U.: Comparison of gene expression in the cisplatin-resistant with its parental cisplatin-sensitive head and neck cancer cell line Cal27 by suppression subtractive hybridisation. Cesar Symposium, 17.-19. Juni 2004 in Rostock

Kongreßvortrag

Gosepath, E.M.: Identification of new genes involved in cisplatin resistance and their expression profile in 18 tumor cell lines. Cesar Symposium, 07. - 09. Juli 2005 in Wien

11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Matthias Kassack für die Überlassung des interessanten Themas, sein in mich gesetztes Vertrauen, seine konstruktive Kritik und die immer vorhandene Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. M. Wiese danke ich sehr für Bereitstellung meiner Stelle während der Promotion und die Übernahme des Koreferats.

Herrn Prof. Dr. U. Jaehde und Herrn PD Dr. H. Vaupel danke ich für ihre Mitarbeit in der Prüfungskommission.

Herrn Prof. Dr. Y. Ko und seiner Mitarbeiterin Frau E. Grünewald möchte ich dafür danken, dass ich in den Laboren der Medizinischen Poliklinik der Uni Bonn mit der Hilfe von Frau E. Grünewald die Subtraktionshybridisierung durchführen durfte.

Silke Weykam danke ich dafür, dass sie mich den gesamten Weg der Promotion in allen Situationen freundschaftlich begleitet hat.

Dr. Niels Eckstein und Dr. Kati Servan des CAESAR, Bonn, danke ich für die Hilfestellungen in Fragen des ELISA und der Klonierung.

Anand Kumar Rotte des Arbeitskreises Prof. Jaehde danke ich für die Vermessung der Cisplatin-Uptake-Proben mittels AAS.

Christian van Bürk, Mathias Weigt und Christop Globisch danke ich für ihre stete Unterstützung bei Computerproblemen jeder Art.

Allen Mitseglern danke ich für ihre Begeisterung am Segeln, die ich z. T. in ihnen wecken durfte und ich freue mich auf ein nächstes Mal.

Andreas Rühl danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und besonders dafür, dass er mich, vor allem in der Endphase dieser Arbeit, immer unterstützt, ermutigt und ertragen hat.

Meiner Familie möchte ich danken, dass sie mir immer meinen Weg ermöglicht und diesen unterstützt hat. So haben sie diese Arbeit erst ermöglicht.

12 Anhang

12.1 Primersequenzen und Accession-Nummern

Alle Sequenzen in Tabelle 12.1 werden in Richtung 5' nach 3' angegeben. Die Oligonukleotide wurden ungereinigt, einzelsträngig und entsalzt bei Operon, Sigma und Invitrogen bezogen.

Tabelle 12.1: Primersequenzen und Accession-Nummern. Ist dem Oligo-Namen ein „s“ angehängt, ist es derjenige Primer des Primerpaares, der über einer Exon-Exon-Schnittstelle liegt. Diese ist dann in der angegebenen Sequenz unterstrichen.

Gen	Accession-Nr.	Oligo-Name	Sequenz 5'-3'
ACTB	NM_001101	ACTB left s	TCCTTCCTGGGCATGGAGT
		ACTB right	GCACTGTGTTGGCAGTACAG
AKR1B1	NM_001628	AKR1B1 left s	TACAGCCCAGGTCCTGATC
		AKR1B1 right	TGGCTGCTCAGTTCAAAGTC
AKR1C1	NM_001353	AKR1C1/2 left	ATTCCCATCGACCAGAGTTG
AKR1C2	NM_001354		TCACTTCCTCACCTGGCTTT
B2M	NM_004048	B2M left	CACCCCCACTGAAAAAGATG
		B2M right s	CAAACCTCCATGATGCTG
CSTA	NM_005213	CSTA left s	ACTACATTAAGGTACGAGCAGGTG
		CSTA right	TGGTATCCAGTAAGTACCAAGTCC
CTSB	NM_147780	CTSB left	ACGGCTGTAATGGTGGCTATC
		CTSB right s	CACCCTACATGGGATTCATAGAG
DKK1	NM_012242	DKK1 left s	TCACACCAAAGGACAAGAAGG
		DKK1 right	ATCTTGGACCAGAAGTGTCTAGC
EGR1	NM_001964	EGR1 left s	GACCGCAGAGTCTTTTCCTG
		EGR1 right	AGCGGCCAGTATAGGTGATG
GUSB	NM_000181	GUSB left s	TTCACCAGGATCCACCTCTG
		GUSB right	AGCACTCTCGTCGGTGACTG
HPRT1	NM_000194	HPRT1 left s	CTGGCGTCGTGATTAGTG

Gen	Accession-Nr.	Oligo-Name	Sequenz 5'-3'
		HPRT1 right	CACACAGAGGGCTACAATG
RPLP0	NM_001002	RPLP0 left s	AGCTCTGGAGAA <u>ACT</u> GCTG
		RPLP0 right	CAGCAGCTGGCACCTTATTG
M13*		forward	GTAAAACGACGGCCAG
		reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
PhosA2	NM_003406	PhosA2 left s	GACAGCTTTT <u>GAT</u> GAAGCCATTG
		PhosA2 right s	TCCACA <u>AT</u> GTCAAGTTGTCTCTCAG
RPL5	NM_000969	RPL5 left	TTGCAGATTACATGCGCTAC
		RPL5 right s	TCC <u>AT</u> CATGTCTGGAGTTACG
RPL13A	NM_012423	RPL13A left s	GCTCAT <u>G</u> AGGCTACGGAAAC
		RPL13A right	TATTGGGCTCAGACCAGGAG
TFR	NM_003234	TFR left	GACTTTGGATCGGTTGGTG
		TFR right s	CAGTAACCGGATGCTT <u>CAC</u>
THBS1	NM_003246	THBS1 left s	TCCAGATGACAG <u>GG</u> ACAACTG
		THBS1 right	GATCTGGGTTGTGGTTGTAGGG
TP53	NM_000546	TP53 left	AGATGAAGCTCCCAGAATGC
		TP53 right s	GGAGTAC <u>G</u> TGCAAGTCACAGAC
UBE2D2	NM_003339	UBE2D2 left s	ACCACCTA <u>AGG</u> TTGCATTTAC
		UBE2D2 right	TAGATCCGAGCAATCTCAGG
E61	NM_000365	E61 left	CTTCCTTGTGGGTGGTGCTTC
		E61 right	TAGTTTGGATGAGGCCACAG
G3PDH5'*			ACCACAGTCCATGCCATCAC
G3PDH3'*			TCCACCACCCTGTTGCTGTA
PCR-Primer 1			CTAATACGACTCACTATAGGGC
Nested PCR-Primer 1*			TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGT
Adapter 1*			
		T7-Promotor	SmaI
		C <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>	CTCGAGCGGCCG <u>CCCGGG</u> CAGGT
		Adapter B (MOS)	
Adapter 2R*		C <u>TAATACGACTCACTATAGGG</u>	CAGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
		T7-Promotor	
Nested PCR-Primer 2R*			AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT
NP2Rs			GGTCGCGGCCGAGGT
cDNA-Synthese-Primer*			TTTT <u>GTACA</u> <u>AGCT</u> T ₃₀ N ₁ N
			RsaI Hind III

* Bestandteil des SSH-Kits

12.2 Cisplatin-Resistenz 18 verschiedener Tumorzelllinien

1321N1

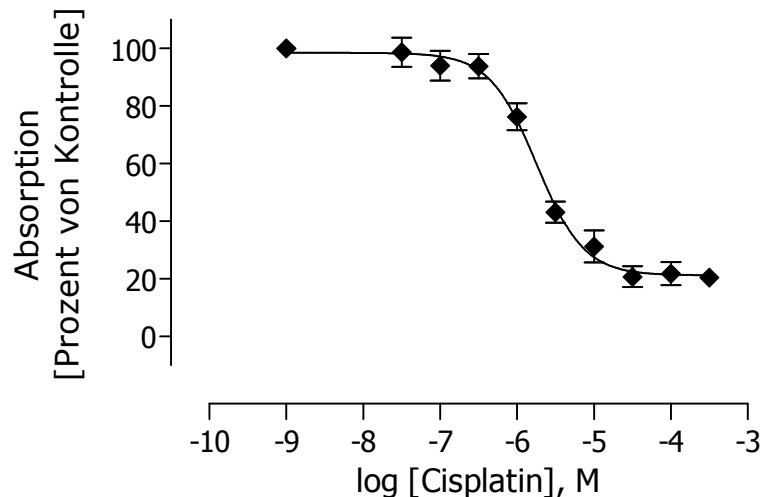


Abbildung 12.1 A: Zusammengefasste MTT-Daten (3 000 Zellen/Well) von 1321N1, $MW \pm SE$, $n=3$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,74 \pm 0,07$; $EC_{50} = 1,81 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

2102

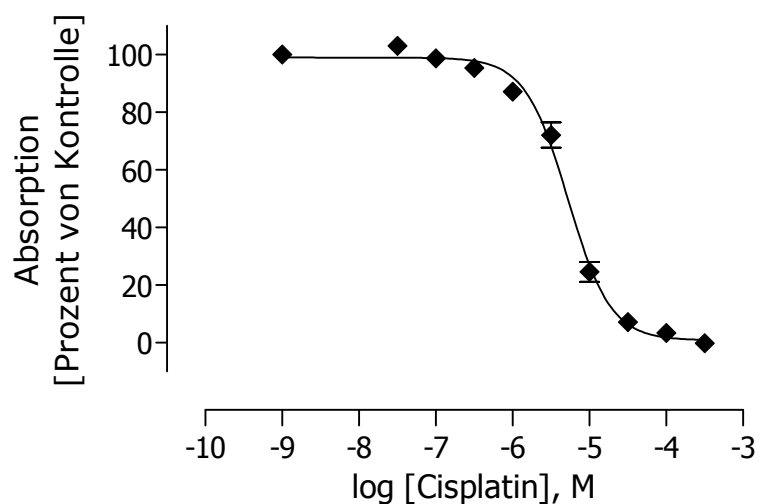


Abbildung 11.1 B: Zusammengefasste MTT-Daten (7 000 Zellen/Well) von 2102, $MW \pm SE$, $n=3$ mit je 3 Replikaten, $pEC_{50} = 5,28 \pm 0,03$; $EC_{50} = 5,25 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

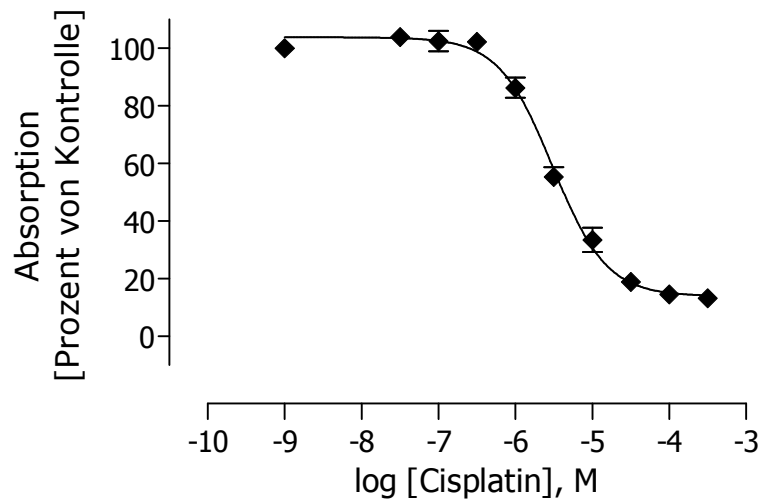
2102KLE

Abbildung 11.1 C: Zusammengefasste MTT-Daten (7 000 Zellen/Well) von 2102KLE, MW \pm SE, n=4 mit 3 Replikaten und n=1 mit 4 Replikaten. $pEC_{50} = 5,51 \pm 0,05$; $EC_{50} = 3,07 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

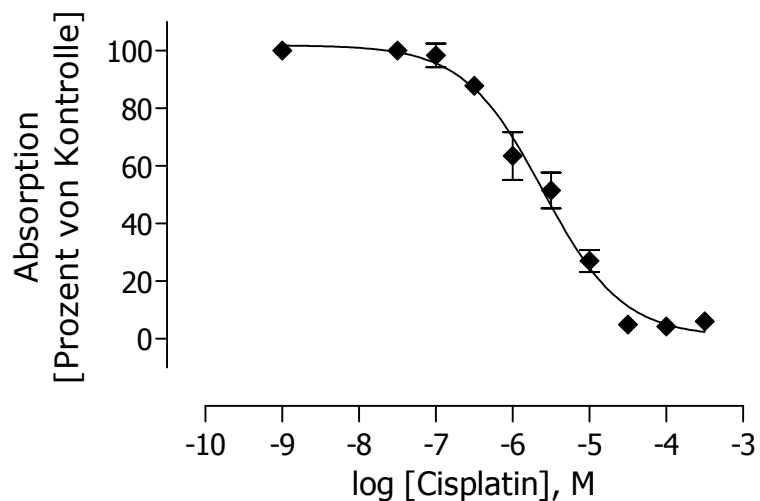
A2780

Abbildung 11.1 D: Zusammengefasste MTT-Daten (8 000 Zellen/Well) von A2780, MW \pm SE, n=5 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,60 \pm 0,08$; $EC_{50} = 2,50 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

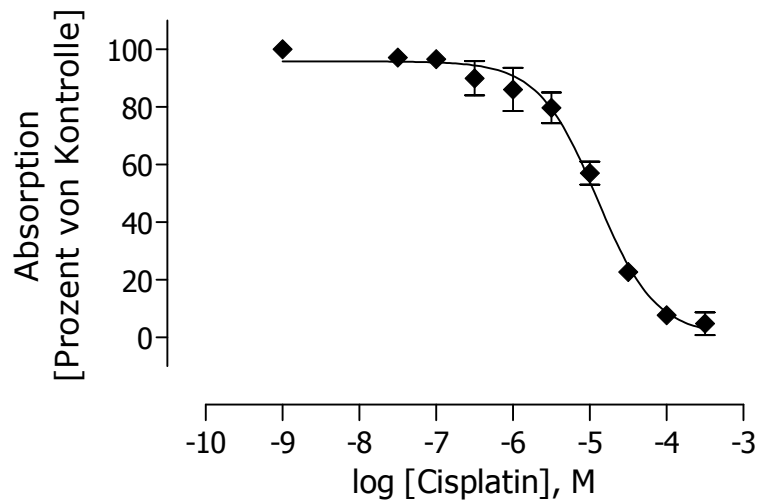
A2780cis

Abbildung 11.1 E: Zusammengefasste MTT-Daten (8 000 Zellen/Well) von A2780cis, MW \pm SE, n=4 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 4,91 \pm 0,07$; $EC_{50} = 12,4 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

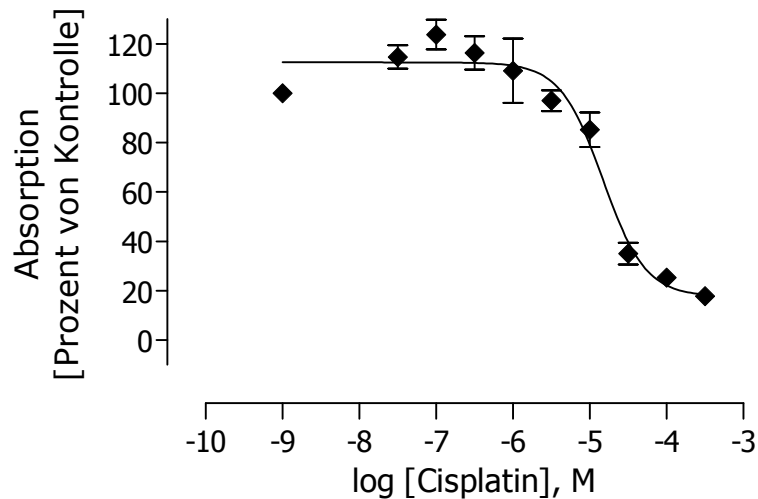
Caco2

Abbildung 11.1 F: Zusammengefasste MTT-Daten (6 000 Zellen/Well) von Caco2, MW \pm SE, n=3 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 4,83 \pm 0,08$; $EC_{50} = 14,8 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

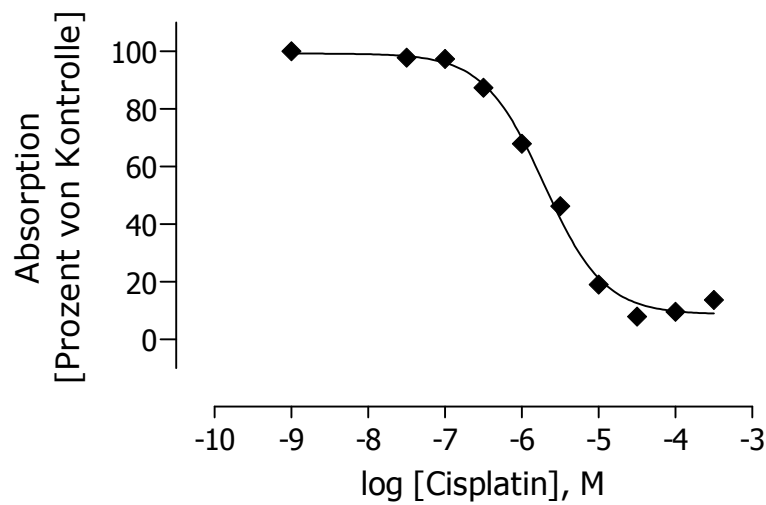
Cal27

Abbildung 11.1 G: Zusammengefasste MTT-Daten (4 000 Zellen/Well) von Cal27, MW \pm SE, n=3 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,71 \pm 0,03$; $EC_{50} = 1,95 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

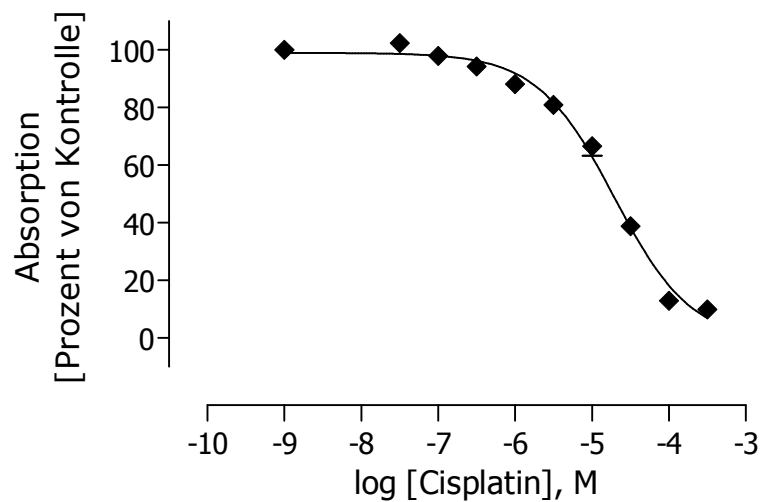
Cal27res

Abbildung 11.1 H: Zusammengefasste MTT-Daten (4 000 Zellen/Well) von Cal27res, MW \pm SE, n=3 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 4,71 \pm 0,07$; $EC_{50} = 19,4 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

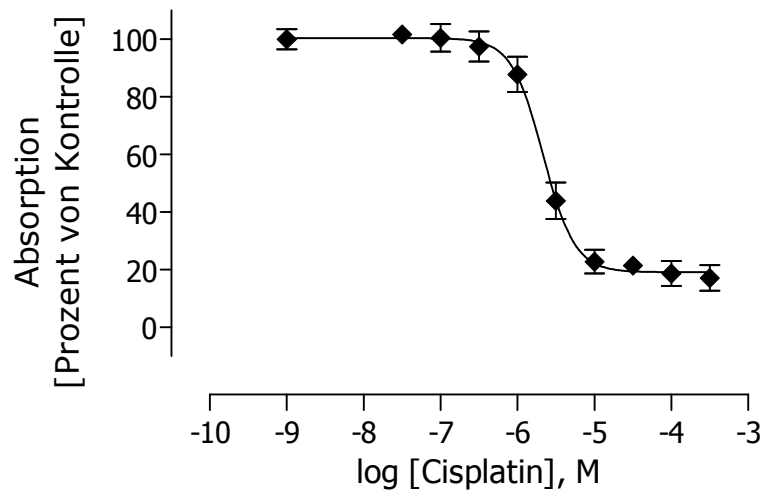
DU145

Abbildung 11.1 I: Zusammengefasste MTT-Daten (6 000 Zellen/Well) von DU145, $MW \pm SE$, $n=3$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,66 \pm 0,05$; $EC_{50} = 2,17 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

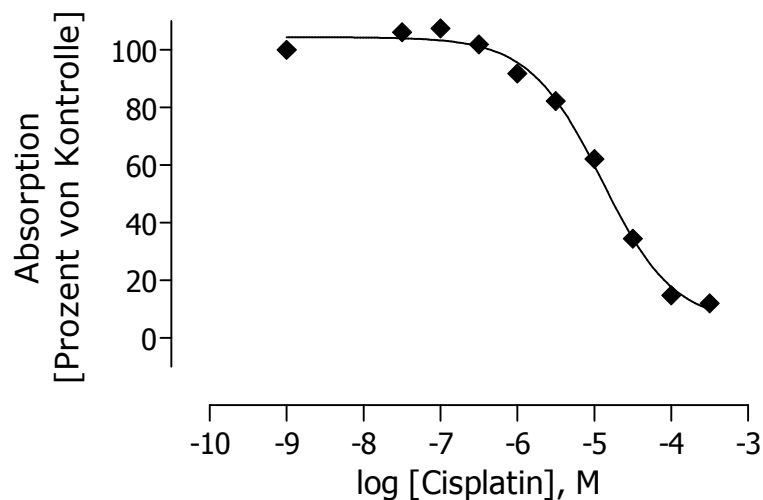
HT29

Abbildung 11.1 J: Zusammengefasste MTT-Daten (6 000 Zellen/Well) von HT29, $MW \pm SE$, $n=3$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 4,90 \pm 0,05$; $EC_{50} = 12,5 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

Hek293

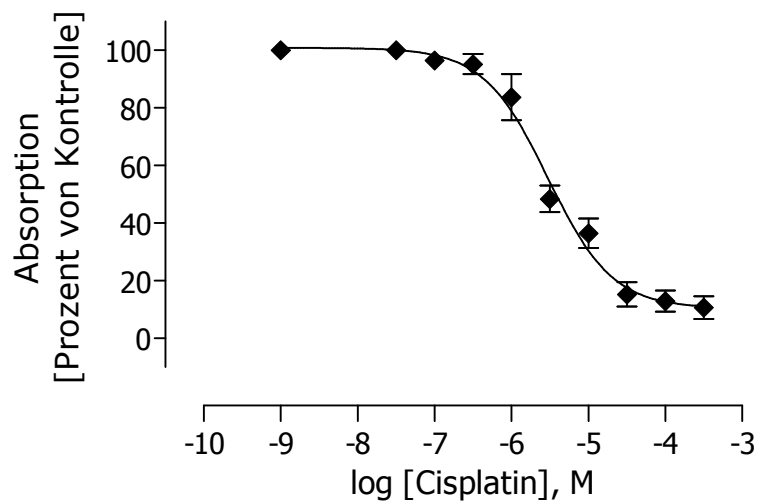


Abbildung 11.1 K: Zusammengefasste MTT-Daten (6 000 Zellen/Well) von Hek293, MW \pm SE, n=3 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,52 \pm 0,07$; $EC_{50} = 2,99 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

HepG2

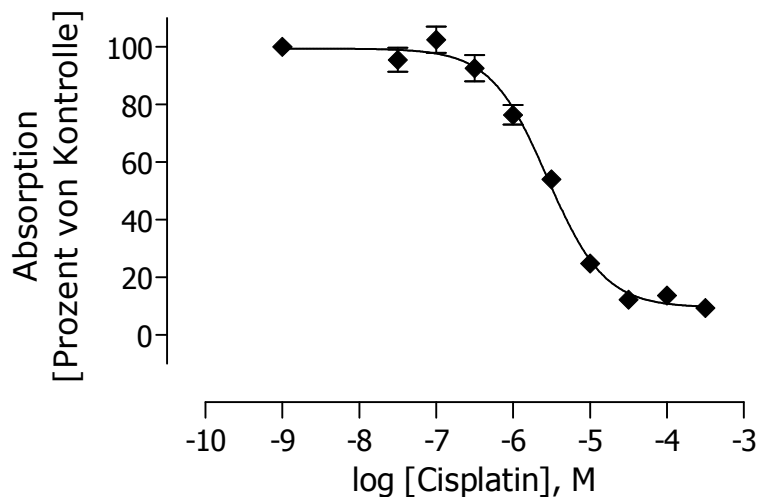


Abbildung 11.1 L: Zusammengefasste MTT-Daten (6 000 Zellen/Well) von HepG2, MW \pm SE, n= 4 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,55 \pm 0,05$; $EC_{50} = 2,81 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

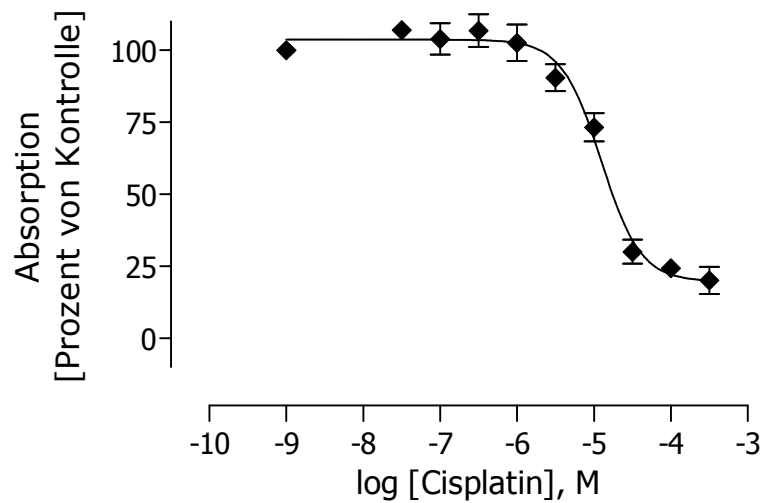
K562

Abbildung 11.1 M: Zusammengefasste MTT-Daten (10 000 Zellen/Well) von K562, MW \pm SE, n=4 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 4,91 \pm 0,06$; $EC_{50} = 12,4 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

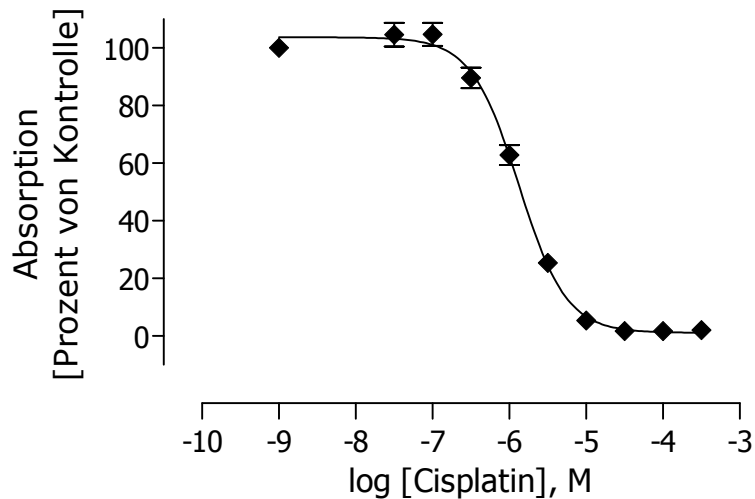
Kyse510

Abbildung 11.1 N: Zusammengefasste MTT-Daten (4 000 Zellen/Well) von Kyse510, MW \pm SE, n=3 mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,88 \pm 0,03$; $EC_{50} = 1,33 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

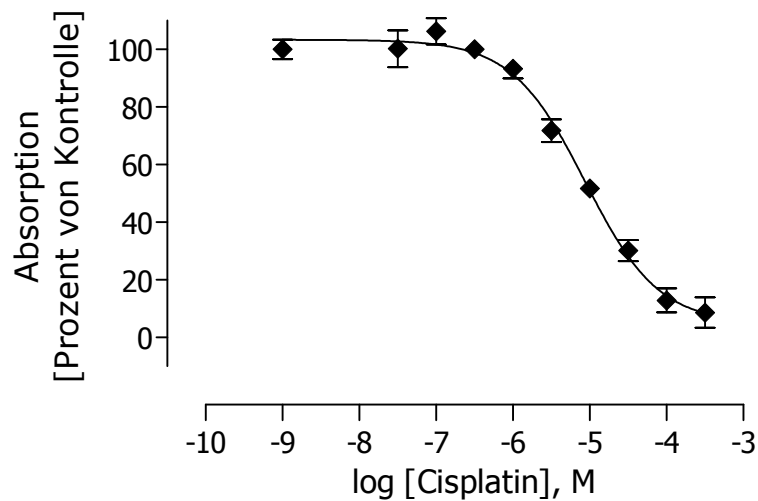
MCF7

Abbildung 11.1 O: Zusammengefasste MTT-Daten (6 000 Zellen/Well) von MCF7, $MW \pm SE$, $n=4$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,06 \pm 0,09$; $EC_{50} = 8,73 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

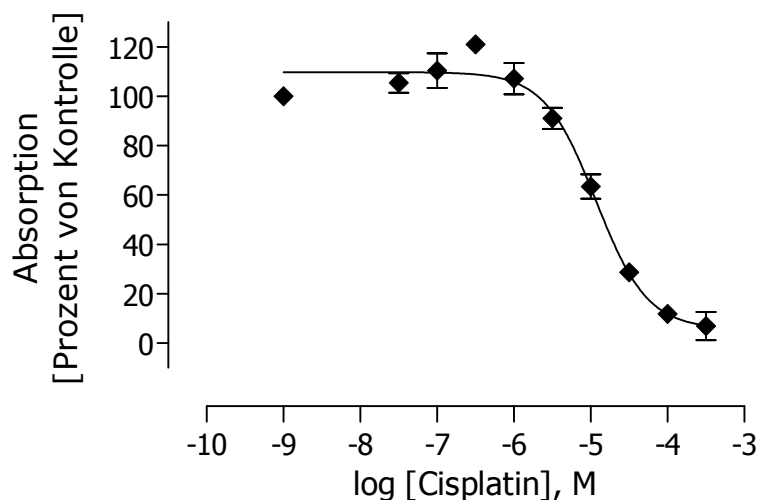
NW1539

Abbildung 11.1 P: Zusammengefasste MTT-Daten (8 000 Zellen/Well) von NW1539, $MW \pm SE$, $n=3$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 4,93 \pm 0,07$; $EC_{50} = 11,7 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

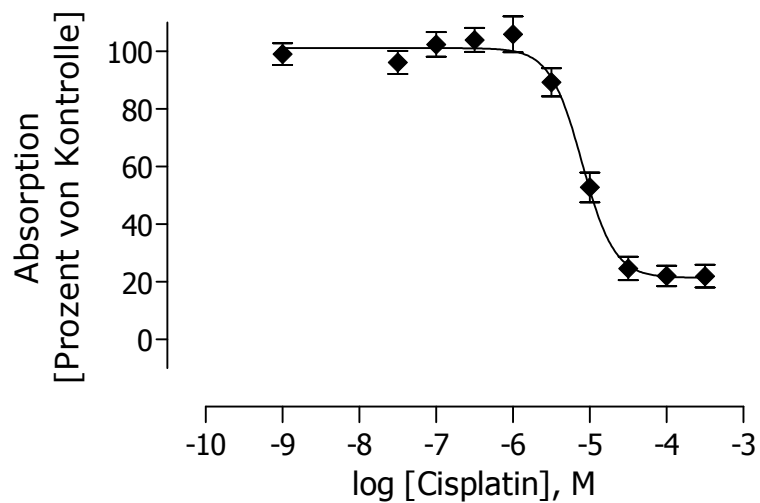
T24

Abbildung 11.1 Q: Zusammengefasste MTT-Daten (1 000 Zellen/Well) von T24, $MW \pm SE$, $n=5$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,10 \pm 0,05$; $EC_{50} = 7,97 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

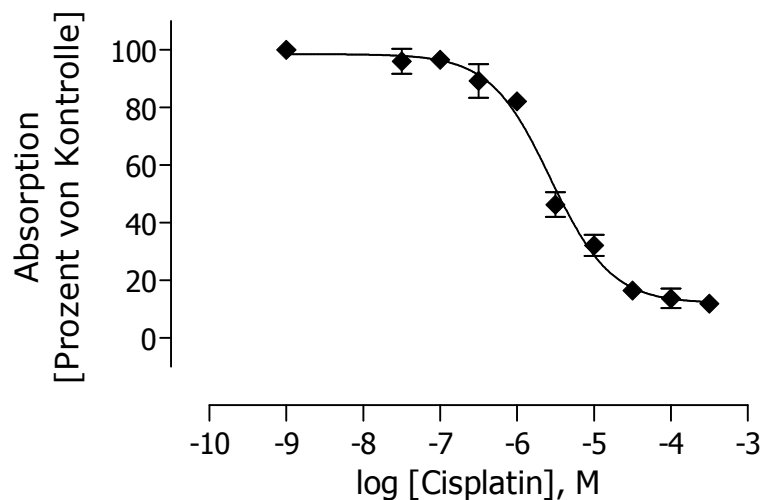
U937

Abbildung 11.1 S: Zusammengefasste MTT-Daten (8 000 Zellen/Well) von U937, $MW \pm SE$, $n=4$ mit je 3 Replikaten. $pEC_{50} = 5,56 \pm 0,06$; $EC_{50} = 2,74 \mu M$. Daten normalisiert auf Mittelwert der Absorption der Kontrolle (Cisplatin-unbehandelte Zellen gleich 10^{-9} M Cisplatin gesetzt).

12.3 Genexpression der 18 Zelllinien

12.3.1 geNorm

Tabelle 12.2: Expressionslevel \pm SD zwischen Cisplatin-behandelten und unbehandelten Zellen ermittelt mit geNorm und deren Signifikanz, berechnet mit ungepaartem, zweiseitigem t-Test. * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$ und * = $p < 0,001$.**

AKR1B1

Zelllinie	Expressionslevel [unbehandelt] \pm SD	Expressionslevel [behandelt] \pm SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 \pm 0,32	2,62 \pm 1,77	
1321N1	1,00 \pm 0,15	1,22 \pm 0,15	
Cal27	1,00 \pm 0,12	5,59 \pm 1,72	*
DU145	1,00 \pm 0,27	0,95 \pm 0,17	
A2780	1,00 \pm 0,12	0,72 \pm 0,08	*
U937	1,00 \pm 0,29	2,16 \pm 0,20	*
HepG2	1,00 \pm 0,13	0,98 \pm 0,06	
Hek293	1,00 \pm 0,13	0,87 \pm 0,11	
2102KLE	1,00 \pm 0,28	1,39 \pm 0,34	
2102	1,00 \pm 0,17	1,50 \pm 0,10	*
T24	1,00 \pm 0,14	1,01 \pm 0,13	
MCF7	1,00 \pm 0,28	41,26 \pm 12,99	*
NW1539	1,00 \pm 0,36	1,78 \pm 0,38	
A2780cis	1,00 \pm 0,10	0,72 \pm 0,12	*
K562	1,00 \pm 0,44	9,12 \pm 1,84	*
HT29	1,00 \pm 0,20	2,50 \pm 0,41	*
Caco2	1,00 \pm 0,11	1,72 \pm 0,14	*
Cal27res	1,00 \pm 0,29	2,05 \pm 0,37	*

Fortsetzung Tabelle 12.2

AKR1C1/2

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 ± 0,40	0,60 ± 0,27	
1321N1	1,00 ± 0,20	7,54 ± 1,38	*
Cal27	1,00 ± 0,09	0,37 ± 0,09	*
DU145	1,00 ± 0,26	0,43 ± 0,21	*
A2780	1,00 ± 0,14	1,88 ± 0,24	*
U937	-	-	
HepG2	1,00 ± 0,13	0,60 ± 0,04	*
Hek293	1,00 ± 0,83	3,71 ± 0,59	*
2102KLE	1,00 ± 0,33	1,06 ± 0,37	
2102	1,00 ± 0,25	0,48 ± 0,05	*
T24	-	-	
MCF7	1,00 ± 0,08	0,10 ± 0,02	*
NW1539	1,00 ± 0,71	44,57 ± 41,93	
A2780cis	1,00 ± 0,15	0,71 ± 0,15	
K562	1,00 ± 0,09	0,81 ± 0,11	
HT29	1,00 ± 0,29	0,56 ± 0,10	
Caco2	1,00 ± 0,44	2,29 ± 0,36	*
Cal27res	1,00 ± 0,59	0,51 ± 0,36	

CSTA

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 ± 0,31	0,83 ± 0,23	
1321N1	1,00 ± 0,29	2,56 ± 0,23	*
Cal27	1,00 ± 0,09	0,94 ± 0,22	
DU145	1,00 ± 0,70	115,85 ± 20,67	*
A2780	1,00 ± 0,19	4,18 ± 0,98	*
U937	1,00 ± 0,17	3,45 ± 0,77	*
HepG2	1,00 ± 0,11	25,17 ± 3,38	*
Hek293	1,00 ± 0,20	3,93 ± 0,74	*

Fortsetzung Tabelle 12.2

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt \pm SD	Expressionslevel behandelt \pm SD	Signifi- kanz
2102KLE	1,00 \pm 0,43	36,25 \pm 12,11	*
2102	1,00 \pm 0,65	97,89 \pm 11,03	*
T24	1,00 \pm 0,52	2,09 \pm 0,45	
MCF7	1,00 \pm 0,08	1,65 \pm 0,39	*
NW1539	1,00 \pm 0,71	22,59 \pm 1,97	*
A2780cis	1,00 \pm 0,32	4,76 \pm 0,72	*
K562	1,00 \pm 0,27	1,10 \pm 0,14	
HT29	1,00 \pm 0,12	0,39 \pm 0,12	*
Caco2	1,00 \pm 0,11	1,44 \pm 0,31	
Cal27res	1,00 \pm 0,30	2,68 \pm 1,49	

CTSB

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt \pm SD	Expressionslevel behandelt \pm SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 \pm 0,24	1,36 \pm 0,54	
1321N1	1,00 \pm 0,17	0,67 \pm 0,05	*
Cal27	1,00 \pm 0,16	0,15 \pm 0,04	*
DU145	1,00 \pm 0,06	0,37 \pm 0,11	*
A2780	1,00 \pm 0,14	1,37 \pm 0,24	
U937	1,00 \pm 0,19	1,08 \pm 0,14	
HepG2	1,00 \pm 0,14	2,77 \pm 0,19	*
Hek293	1,00 \pm 0,30	0,62 \pm 0,09	
2102KLE	1,00 \pm 0,28	3,35 \pm 1,21	*
2102	1,00 \pm 0,15	3,29 \pm 0,22	*
T24	1,00 \pm 0,16	0,56 \pm 0,06	*
MCF7	1,00 \pm 0,16	1,03 \pm 0,25	
NW1539	1,00 \pm 0,19	1,13 \pm 0,14	
A2780cis	1,00 \pm 0,25	1,51 \pm 0,24	
K562	1,00 \pm 0,09	2,91 \pm 0,39	*
HT29	1,00 \pm 0,08	1,29 \pm 0,16	
Caco2	1,00 \pm 0,11	1,49 \pm 0,09	*
Cal27res	1,00 \pm 0,30	1,23 \pm 0,24	

Fortsetzung Tabelle 12.2

DKK1

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 ± 0,29	3,59 ± 1,88	
1321N1	1,00 ± 0,16	0,66 ± 0,04	*
Cal27	1,00 ± 0,42	11,26 ± 2,72	*
DU145	1,00 ± 0,10	0,71 ± 0,21	
A2780	1,00 ± 0,30	1,36 ± 0,21	
U937	1,00 ± 0,71	4,12 ± 2,88	
HepG2	1,00 ± 0,12	0,59 ± 0,04	*
Hek293	1,00 ± 0,22	1,68 ± 0,28	*
2102KLE	1,00 ± 0,74	1,24 ± 1,17	
2102	1,00 ± 0,15	0,42 ± 0,04	*
T24	1,00 ± 0,54	1,70 ± 0,36	
MCF7	1,00 ± 0,11	2,89 ± 0,74	*
NW1539	1,00 ± 0,58	0,80 ± 0,11	
A2780cis	1,00 ± 0,18	1,13 ± 0,14	
K562	1,00 ± 0,70	45,66 ± 32,04	
HT29	1,00 ± 0,23	5,57 ± 0,83	*
Caco2	1,00 ± 0,15	1,04 ± 0,10	
Cal27res	1,00 ± 0,38	2,08 ± 0,40	*

EGR1

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 ± 0,21	0,15 ± 0,01	
1321N1	1,00 ± 0,14	31,57 ± 3,42	*
Cal27	1,00 ± 0,09	2,17 ± 1,06	
DU145	1,00 ± 0,06	1,23 ± 0,22	
A2780	1,00 ± 0,13	135,53 ± 26,38	*
U937	1,00 ± 0,71	99,99 ± 76,57	
HepG2	1,00 ± 0,21	2,56 ± 0,57	*
Hek293	1,00 ± 0,14	1,78 ± 0,21	*

Fortsetzung Tabelle 12.2

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt \pm SD	Expressionslevel behandelt \pm SD	Signifi- kanz
2102KLE	1,00 \pm 0,27	1,86 \pm 0,65	
2102	1,00 \pm 0,34	4,83 \pm 1,41	*
T24	1,00 \pm 0,33	9,82 \pm 1,07	*
MCF7	1,00 \pm 0,11	2,66 \pm 0,82	*
NW1539	1,00 \pm 0,15	0,09 \pm 0,01	*
A2780cis	1,00 \pm 0,39	2,28 \pm 0,24	*
K562	1,00 \pm 0,10	3,08 \pm 0,57	*
HT29	1,00 \pm 0,12	2,59 \pm 0,28	*
Caco2	1,00 \pm 0,14	7,30 \pm 1,63	*
Cal27res	1,00 \pm 0,47	2,56 \pm 0,38	*

p53

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt \pm SD	Expressionslevel behandelt \pm SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 \pm 0,25	0,59 \pm 0,30	
1321N1	1,00 \pm 0,15	2,73 \pm 0,19	*
Cal27	1,00 \pm 0,15	3,67 \pm 0,98	*
DU145	1,00 \pm 0,45	5,16 \pm 1,09	*
A2780	1,00 \pm 0,16	4,92 \pm 0,67	*
U937	1,00 \pm 0,43	2,11 \pm 0,50	*
HepG2	1,00 \pm 0,22	2,84 \pm 0,31	*
Hek293	1,00 \pm 0,10	2,21 \pm 0,26	*
2102KLE	1,00 \pm 0,43	1,56 \pm 0,37	*
2102	1,00 \pm 0,22	1,85 \pm 0,14	*
T24	1,00 \pm 0,19	2,18 \pm 0,24	*
MCF7	1,00 \pm 0,26	2,49 \pm 0,58	*
NW1539	1,00 \pm 0,18	2,33 \pm 0,45	*
A2780cis	1,00 \pm 0,10	1,96 \pm 0,20	*
K562	1,00 \pm 0,33	2,70 \pm 0,30	*
HT29	1,00 \pm 0,10	0,81 \pm 0,09	
Caco2	1,00 \pm 0,13	2,78 \pm 0,11	*
Cal27res	1,00 \pm 0,47	3,28 \pm 0,95	*

Fortsetzung Tabelle 12.2

RPL5

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 ± 0,21	0,69 ± 0,24	
1321N1	1,00 ± 0,24	2,26 ± 0,19	*
Cal27	1,00 ± 0,45	1,04 ± 0,30	
DU145	1,00 ± 0,22	1,83 ± 0,42	*
A2780	1,00 ± 0,32	0,68 ± 0,08	
U937	1,00 ± 0,29	1,22 ± 0,13	
HepG2	1,00 ± 0,27	0,60 ± 0,05	
Hek293	1,00 ± 0,05	1,11 ± 0,25	
2102KLE	1,00 ± 0,27	1,16 ± 0,27	
2102	1,00 ± 0,28	0,73 ± 0,08	
T24	1,00 ± 0,22	0,77 ± 0,19	
MCF7	1,00 ± 0,32	0,76 ± 0,21	
NW1539	1,00 ± 0,22	1,08 ± 0,10	
A2780cis	1,00 ± 0,25	0,99 ± 0,22	
K562	1,00 ± 0,10	1,09 ± 0,13	
HT29	1,00 ± 0,21	0,26 ± 0,03	*
Caco2	1,00 ± 0,17	1,10 ± 0,25	
Cal27res	1,00 ± 0,30	1,07 ± 0,15	

THBS1

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
Kyse510	1,00 ± 0,38	21,56 ± 2,63	*
1321N1	1,00 ± 0,24	7,25 ± 1,20	*
Cal27	1,00 ± 0,20	20,79 ± 5,36	*
DU145	1,00 ± 0,21	1,92 ± 0,64	
A2780	1,00 ± 0,25	39,89 ± 15,79	*
U937	-	-	
HepG2	1,00 ± 0,22	0,82 ± 0,13	
Hek293	1,00 ± 0,06	0,66 ± 0,25	

Fortsetzung Tabelle 12.2

Zelllinie	Expressionslevel unbehandelt \pm SD	Expressionslevel behandelt \pm SD	Signifi- kanz
2102KLE	1,00 \pm 0,33	4,53 \pm 1,09	*
2102	1,00 \pm 0,45	7,03 \pm 1,06	*
T24	1,00 \pm 0,24	1,63 \pm 0,16	*
MCF7	1,00 \pm 0,36	3,07 \pm 0,92	*
NW1539	1,00 \pm 0,14	2,16 \pm 0,23	*
A2780cis	1,00 \pm 0,14	14,22 \pm 4,39	*
K562	1,00 \pm 0,08	73,24 \pm 14,65	*
HT29	1,00 \pm 0,11	4,92 \pm 0,60	*
Caco2	1,00 \pm 0,17	0,28 \pm 0,08	*
Cal27res	1,00 \pm 0,35	1,29 \pm 0,59	

12.3.2 Vergleich der Zellpärchen

Tabelle 12.3: Expressionslevel der Zelllinienpärchen, Vergleich der sensitiven mit den resistenten Zellen für die unbehandelten (-) und behandelten (+) Proben und Vergleich unbehandelt mit behandelt für die sensitiven und die resistenten Zelllinien.

Cal27 unbehandelt (-) und behandelt (+)

Gen und Behandlung		Expressionslevel Cal27sens \pm SD	Expressionslevel Cal27res \pm SD	Signifi- kanz
AKR1B1	-	1,00 \pm 0,12	6,56 \pm 1,93	**
	+	1,00 \pm 0,31	2,40 \pm 0,42	**
AKR1C1/2	-	1,00 \pm 0,09	0,14 \pm 0,08	***
	+	1,00 \pm 0,24	0,20 \pm 0,14	**
CSTA	-	1,00 \pm 0,09	0,11 \pm 0,03	***
	+	1,00 \pm 0,23	0,32 \pm 0,18	*
CTSB	-	1,00 \pm 0,16	0,14 \pm 0,04	***
	+	1,00 \pm 0,28	1,13 \pm 0,22	
DKK1	-	1,00 \pm 0,42	6,72 \pm 2,57	*
	+	1,00 \pm 0,24	1,24 \pm 0,24	

Fortsetzung Tabelle 12.3

Gen und Behandlung		Expressionslevel Cal27sens \pm SD	Expressionslevel Cal27res \pm SD	Signifikanz
EGR1	-	1,00 \pm 0,09	10,10 \pm 4,70	*
	+	1,00 \pm 0,49	11,93 \pm 1,77	***
p53	-	1,00 \pm 0,15	2,07 \pm 0,97	
	+	1,00 \pm 0,27	1,85 \pm 0,54	
RPL5	-	1,00 \pm 0,45	1,10 \pm 0,33	
	+	1,00 \pm 0,29	1,13 \pm 0,16	
THBS1	-	1,00 \pm 0,20	9,34 \pm 3,28	*
	+	1,00 \pm 0,26	0,58 \pm 0,27	

A2780 unbehandelt (-) und behandelt (+)

Gen und Behandlung		Expressionslevel A2780 \pm SD	Expressionslevel A2780cis \pm SD	Signifikanz
AKR1B1	-	1,00 \pm 0,12	1,64 \pm 0,16	**
	+	1,00 \pm 0,12	1,63 \pm 0,28	*
AKR1C1/2	-	1,00 \pm 0,14	25,16 \pm 3,88	***
	+	1,00 \pm 0,13	9,54 \pm 1,95	**
CSTA	-	1,00 \pm 0,19	0,78 \pm 0,24	-
	+	1,00 \pm 0,23	0,88 \pm 0,13	
CTSB	-	1,00 \pm 0,14	0,94 \pm 0,24	-
	+	1,00 \pm 0,17	1,03 \pm 0,16	
DKK1	-	1,00 \pm 0,30	1,18 \pm 0,21	-
	+	1,00 \pm 0,15	0,98 \pm 0,12	
EGR1	-	1,00 \pm 0,13	43,27 \pm 16,92	*
	+	1,00 \pm 0,19	0,73 \pm 0,08	
p53	-	1,00 \pm 0,16	1,25 \pm 0,12	-
	+	1,00 \pm 0,14	0,50 \pm 0,05	**
RPL5	-	1,00 \pm 0,32	0,46 \pm 0,11	
	+	1,00 \pm 0,12	0,67 \pm 0,15	*
THBS1	-	1,00 \pm 0,25	0,02 \pm 0,00	**
	+	1,00 \pm 0,40	0,01 \pm 0,00	*

Fortsetzung Tabelle 12.3

Cal27 (s) und Cal27res (r)

Gen und Zelllinie		Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
AKR1B1	s	1,00 ± 0,12	5,59 ± 1,72	**
	r	1,00 ± 0,29	2,05 ± 0,37	*
AKR1C1/2	s	1,00 ± 0,09	0,37 ± 0,09	**
	r	1,00 ± 0,59	0,51 ± 0,36	
CSTA	s	1,00 ± 0,09	0,94 ± 0,22	
	r	1,00 ± 0,30	2,68 ± 1,49	
CTSB	s	1,00 ± 0,16	0,15 ± 0,04	***
	r	1,00 ± 0,30	1,23 ± 0,24	
DKK1	s	1,00 ± 0,42	11,26 ± 2,72	**
	r	1,00 ± 0,38	2,08 ± 0,40	*
EGR1	s	1,00 ± 0,09	2,17 ± 1,06	
	r	1,00 ± 0,47	2,56 ± 0,38	*
p53	s	1,00 ± 0,15	3,67 ± 0,98	**
	r	1,00 ± 0,47	3,28 ± 0,95	
RPL5	s	1,00 ± 0,45	1,04 ± 0,30	
	r	1,00 ± 0,30	1,07 ± 0,15	
THBS1	s	1,00 ± 0,20	20,79 ± 5,36	**
	r	1,00 ± 0,35	1,29 ± 0,59	

A2780 (s) und A2780cis (r)

Gen und Zelllinie		Expressionslevel unbehandelt ± SD	Expressionslevel behandelt ± SD	Signifi- kanz
AKR1B1	s	1,00 ± 0,12	0,72 ± 0,08	*
	r	1,00 ± 0,10	0,72 ± 0,12	*
AKR1C1/2	s	1,00 ± 0,14	1,88 ± 0,24	**
	r	1,00 ± 0,15	0,71 ± 0,15	
CSTA	s	1,00 ± 0,19	4,18 ± 0,98	**
	r	1,00 ± 0,32	4,76 ± 0,72	**
CTSB	s	1,00 ± 0,14	1,37 ± 0,24	
	r	1,00 ± 0,25	1,51 ± 0,24	

Fortsetzung Tabelle 12.3

Gen und Zelllinie		Expressionslevel unbehandelt \pm SD	Expressionslevel behandelt \pm SD	Signifikanz
DKK1	s	1,00 \pm 0,30	1,36 \pm 0,21	
	r	1,00 \pm 0,18	1,13 \pm 0,14	
EGR1	s	1,00 \pm 0,13	135,50 \pm 26,38	***
	r	1,00 \pm 0,39	2,27 \pm 0,24	**
p53	s	1,00 \pm 0,16	4,92 \pm 0,67	***
	r	1,00 \pm 0,10	1,96 \pm 0,20	**
RPL5	s	1,00 \pm 0,32	0,68 \pm 0,08	
	r	1,00 \pm 0,25	0,99 \pm 0,22	
THBS1	s	1,00 \pm 0,25	39,89 \pm 15,79	*
	r	1,00 \pm 0,14	14,22 \pm 4,39	**

12.3.3 NormIt

Tabelle 12.4: Berechnung der differentiellen Genexpressionen der verschiedenen Gene in den untersuchten Zelllinien aus den mittels NormIt korrigierten C_T -Werten. Der Expressionsfaktor gibt das Verhältnis der Expression von Cal7res bezogen auf Cal27 wieder. Die Signifikanzniveaus wurden mittels zweiseitigem, ungepaartem t-Test durch Vergleich der C_T -Werte \pm SD der unbehandelten mit der jeweiligen behandelten Probe erhalten: * = $p < 0,05$, ** = $p < 0,01$, * = $p < 0,001$.**

AKR1B1

AKR1B1	$C_{T(\text{kor.})} \pm \text{SD}$ unbehandelt	$C_{T(\text{kor.})} \pm \text{SD}$ behandelt	ΔCT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	22,58 \pm 0,36	22,82 \pm 0,97	-0,24 \pm 1,03	0,85 \pm 0,61	n. s.
1321N1	22,09 \pm 0,13	22,31 \pm 0,16	-0,22 \pm 0,2	0,86 \pm 0,12	n. s.
Cal27	24,58 \pm 0,12	21,55 \pm 0,29	3,03 \pm 0,32	8,18 \pm 1,80	***
DU145	26,78 \pm 0,38	25,28 \pm 0,02	1,50 \pm 0,38	2,83 \pm 0,75	**
A2780	22,37 \pm 0,01	21,02 \pm 0,00	1,35 \pm 0,00	2,55 \pm 0,01	***
U937	30,68 \pm 0,34	27,49 \pm 0,03	2,61 \pm 0,34	6,11 \pm 1,44	***
HepG2	20,74 \pm 0,10	21,57 \pm 0,02	-0,83 \pm 0,10	0,56 \pm 0,04	***
Hek293	21,13 \pm 0,18	20,78 \pm 0,08	0,35 \pm 0,2	1,27 \pm 0,18	*
2102KLE	24,88 \pm 0,11	23,24 \pm 0,12	1,64 \pm 0,17	3,12 \pm 0,36	***
2102	20,39 \pm 0,11	20,32 \pm 0,03	0,08 \pm 0,11	1,05 \pm 0,08	n. s.
T24	23,58 \pm 0,07	21,81 \pm 0,11	1,77 \pm 0,13	3,42 \pm 0,31	***
MCF7	32,97 \pm 0,38	26,50 \pm 0,30	6,48 \pm 0,49	88,98 \pm 30,17	***
NW1539	25,61 \pm 0,48	24,58 \pm 0,29	1,02 \pm 0,56	2,03 \pm 0,79	*
A2780cis	20,72 \pm 0,10	18,95 \pm 0,20	1,77 \pm 0,23	3,42 \pm 0,54	***
K562	33,02 \pm 0,63	30,63 \pm 0,24	2,39 \pm 0,67	5,25 \pm 2,45	**
HT29	31,48 \pm 0,27	30,70 \pm 0,20	0,78 \pm 0,34	1,72 \pm 0,4	*
Caco2	23,51 \pm 0,03	23,00 \pm 0,11	0,50 \pm 0,11	1,42 \pm 0,11	**
Cal27res	23,58 \pm 0,02	23,03 \pm 0,17	0,56 \pm 0,17	1,47 \pm 0,17	**

Fortsetzung Tabelle 12.4

AKR1C1/2

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	19,65	22,01 ± 0,63		5,13	
1321N1	24,36 ± 0,22	21,95 ± 0,25	2,41 ± 0,33	5,31 ± 1,23	***
Cal27	24,81 ± 0,06	25,70 ± 0,07	-0,89 ± 0,09	0,54 ± 0,03	***
DU145	32,42 ± 0,36	32,08 ± 0,68	0,34 ± 0,77	1,27 ± 0,68	n. S.
A2780	29,62 ± 0,10	26,88 ± 0,08	2,74 ± 0,13	6,67 ± 0,61	***
U937	-	-	-	-	-
HepG2	17,33 ± 0,10	18,88 ± 0,03	-1,55 ± 0,10	0,34 ± 0,02	***
Hek293	32,89 ± 1,20	30,46 ± 0,16	2,44 ± 1,21	5,41 ± 4,52	*
2102KLE	31,14 ± 0,28	29,89 ± 0,37	1,25 ± 0,46	2,37 ± 0,76	**
2102	27,78 ± 0,28	29,34 ± 0,11	-1,56 ± 0,30	0,34 ± 0,07	***
T24	-	-	-	-	-
MCF7	22,18 ± 0,01	24,36 ± 0,05	-2,18 ± 0,05	0,22 ± 0,01	***
NW1539	-	31,15 ± 1,35			
A2780cis	24,04 ± 0,20	22,27 ± 0,25	1,76 ± 0,32	3,39 ± 0,76	***
K562	23,52 ± 0,08	24,63 ± 0,12	-1,11 ± 0,14	0,46 ± 0,05	***
HT29	27,02 ± 0,41	28,39 ± 0,22	-1,37 ± 0,46	0,39 ± 0,12	***
Caco2	24,11 ± 0,62	23,20 ± 0,22	0,92 ± 0,65	1,89 ± 0,86	n. S.
Cal27res	29,34 ± 0,75	-	-	-	

CSTA

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	21,70 ± 0,33	23,60 ± 0,39	-1,90 ± 0,51	0,27 ± 0,09	**
1321N1	26,28 ± 0,38	25,43 ± 0,10	0,85 ± 0,39	1,81 ± 0,49	*
Cal27	23,76 ± 0,05	23,31 ± 0,06	0,46 ± 0,08	1,37 ± 0,07	***
DU145	-	28,63 ± 0,05			
A2780	29,18 ± 0,22	25,29 ± 0,29	3,89 ± 0,36	14,84 ± 3,74	***
U937	23,43 ± 0,04	19,56 ± 0,29	3,29 ± 0,30	9,75 ± 2,01	***
HepG2	26,12 ± 0,05	22,27 ± 0,17	3,85 ± 0,18	14,46 ± 1,79	***
Hek293	27,26 ± 0,28	24,74 ± 0,22	2,52 ± 0,35	5,72 ± 1,39	***

Fortsetzung Tabelle 12.4

2102KLE	32,72 ± 0,49	26,38 ± 0,35	6,34 ± 0,60	81,21 ± 33,68	***
2102	31,65 ± 0,91	25,54 ± 0,13	6,11 ± 0,91	68,86 ± 43,67	***
T24	31,60 ± 0,72	28,77 ± 0,27	2,82 ± 0,77	7,07 ± 3,80	**
MCF7	25,35 ± 0,05	23,52 ± 0,01	1,83 ± 0,05	3,55 ± 0,13	***
NW1539	33,40	28,71 ± 0,07	4,69	25,84	
A2780cis	28,61 ± 0,44	24,11 ± 0,16	4,50 ± 0,47	22,62 ± 7,41	***
K562	33,10 ± 0,37	33,75 ± 0,08	-0,66 ± 0,38	0,64 ± 0,17	*
HT29	30,15 ± 0,13	32,03 ± 0,42	-1,89 ± 0,44	0,27 ± 0,08	**
Caco2	29,23 ± 0,03	28,98 ± 0,30	0,25 ± 0,30	1,19 ± 0,25	n. s.
Cal27res	28,64 ± 0,07	27,70 ± 0,77	0,95 ± 0,78	1,93 ± 1,04	n. s.

CTSB

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	21,54 ± 0,17	22,72 ± 0,56	-1,18 ± 0,58	0,44 ± 0,18	*
1321N1	23,12 ± 0,17	24,20 ± 0,07	-1,08 ± 0,19	0,47 ± 0,06	***
Cal27	20,90 ± 0,20	23,10 ± 0,23	-2,20 ± 0,31	0,22 ± 0,05	***
DU145	25,93 ± 0,04	25,78 ± 0,35	0,15 ± 0,36	1,11 ± 0,27	n. s.
A2780	24,01 ± 0,11	21,73 ± 0,19	2,28 ± 0,21	4,87 ± 0,72	***
U937	22,25 ± 0,14	20,06 ± 0,14	1,61 ± 0,20	3,05 ± 0,41	***
HepG2	20,71 ± 0,12	20,04 ± 0,04	0,67 ± 0,13	1,59 ± 0,14	***
Hek293	23,44 ± 0,43	23,59 ± 0,13	-0,16 ± 0,45	0,90 ± 0,28	n. s.
2102KLE	25,85 ± 0,14	22,94 ± 0,40	2,91 ± 0,42	7,51 ± 2,20	***
2102	24,23 ± 0,01	23,02 ± 0,01	1,21 ± 0,01	2,31 ± 0,02	***
T24	22,78 ± 0,14	21,85 ± 0,06	0,93 ± 0,15	1,90 ± 0,2	***
MCF7	25,65 ± 0,21	24,49 ± 0,07	1,16 ± 0,22	2,23 ± 0,34	***
NW1539	23,69 ± 0,20	23,32 ± 0,15	0,38 ± 0,25	1,30 ± 0,23	n. s.
A2780cis	23,17 ± 0,35	20,33 ± 0,17	2,875 ± 0,39	7,19 ± 1,95	***
K562	25,47 ± 0,09	24,73 ± 0,11	0,75 ± 0,14	1,68 ± 0,17	***
HT29	23,50 ± 0,04	23,68 ± 0,13	-0,18 ± 0,14	0,88 ± 0,09	n. s.
Caco2	23,72 ± 0,02	23,42 ± 0,07	0,30 ± 0,07	1,23 ± 0,06	**
Cal27res	25,49 ± 0,10	25,66 ± 0,20	-0,18 ± 0,22	0,89 ± 0,14	n. s.

Fortsetzung Tabelle 12.4

DKK1

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	26,13 ± 0,30	25,91 ± 0,75	0,22 ± 0,81	1,16 ± 0,65	n. s.
1321N1	29,18 ± 0,14	30,27 ± 0,01	-1,10 ± 0,14	0,47 ± 0,05	***
Cal27	25,50 ± 0,60	21,46 ± 0,10	4,04 ± 0,60	16,47 ± 6,90	***
DU145	27,12 ± 0,13	26,05 ± 0,34	1,07 ± 0,36	2,10 ± 0,52	**
A2780	21,71 ± 0,40	19,44 ± 0,14	2,27 ± 0,42	4,83 ± 1,41	***
U937	-	36,5	-		
HepG2	18,26 ± 0,08	19,83 ± 0,03	-1,57 ± 0,08	0,34 ± 0,02	***
Hek293	28,78 ± 0,31	27,49 ± 0,17	1,30 ± 0,35	2,45 ± 0,60	**
2102KLE	32,0	30,51 ± 1,31			
2102	24,22 ± 0,03	25,99 ± 0,11	-1,76 ± 0,11	0,29 ± 0,02	***
T24	27,00 ± 0,75	24,47 ± 0,27	2,53 ± 0,80	5,77 ± 3,18	**
MCF7	25,18 ± 0,11	22,54 ± 0,15	2,64 ± 0,19	6,23 ± 0,80	***
NW1539	26,45 ± 0,81	26,58 ± 0,16	-0,13 ± 0,83	0,91 ± 0,52	n. s.
A2780cis	20,54 ± 0,24	18,11 ± 0,09	2,43 ± 0,25	5,37 ± 0,95	***
K562	-	-	-	-	-
HT29	23,68 ± 0,31	21,74 ± 0,18	1,94 ± 0,36	3,83 ± 0,96	***
Caco2	20,41 ± 0,15	20,64 ± 0,12	-0,23 ± 0,19	0,86 ± 0,11	n. s.
Cal27res	24,47 ± 0,35	23,89 ± 0,19	0,58 ± 0,40	1,50 ± 0,42	n. s.

EGR1

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	24,04 ± 0,09	28,41 ± 0,05	-4,36 ± 0,10	0,05 ± 0,00	***
1321N1	28,93 ± 0,11	24,46 ± 0,13	4,47 ± 0,16	22,23 ± 2,54	***
Cal27	27,57 ± 0,04	25,91 ± 0,62	1,67 ± 0,63	3,17 ± 1,38	***
DU145	27,71 ± 0,03	25,84 ± 0,08	1,88 ± 0,08	3,67 ± 0,21	***
A2780	32,28 ± 0,09	23,37 ± 0,23	8,91 ± 0,24	480,66 ± 80,81	***
U937	-	29,34 ± 1,10			
HepG2	28,60 ± 0,26	28,05 ± 0,31	0,56 ± 0,40	1,47 ± 0,41	n. s.
Hek293	31,39 ± 0,19	30,01 ± 0,01	1,38 ± 0,19	2,60 ± 0,34	***

Fortsetzung Tabelle 12.4

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
2102KLE	30,63 ± 0,02	28,57 ± 0,38	2,06 ± 0,38	4,16 ± 1,09	***
2102	30,63 ± 0,44	28,86 ± 0,41	1,77 ± 0,60	3,40 ± 1,42	**
T24	29,93 ± 0,44	24,88 ± 0,07	5,06 ± 0,45	33,28 ± 10,27	***
MCF7	30,60 ± 0,12	28,08 ± 0,29	2,52 ± 0,31	5,74 ± 1,24	***
NW1539	24,99 ± 0,11	28,20 ± 0,16	-3,21 ± 0,20	0,11 ± 0,11	***
A2780cis	25,91 ± 0,56	22,48 ± 0,02	3,44 ± 0,56	10,83 ± 4,17	***
K562	26,99 ± 0,09	26,17 ± 0,22	0,83 ± 0,23	1,77 ± 0,29	**
HT29	27,29 ± 0,12	26,46 ± 0,10	0,83 ± 0,16	1,78 ± 0,19	***
Caco2	29,82 ± 0,12	27,23 ± 0,32	2,59 ± 0,33	6,03 ± 1,42	***
Cal27res	25,95 ± 0,52	25,07 ± 0,08	0,88 ± 0,52	1,84 ± 0,67	*

p53

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	25,00 ± 0,22	27,38 ± 0,72	-2,38 ± 0,75	0,19 ± 0,10	**
1321N1	24,97 ± 0,13	24,03 ± 0,04	0,94 ± 0,13	1,92 ± 0,18	***
Cal27	23,93 ± 0,19	21,51 ± 0,19	2,43 ± 0,27	5,37 ± 1,01	***
DU145	28,69 ± 0,65	24,75 ± 0,17	3,94 ± 0,67	15,36 ± 7,14	***
A2780	26,57 ± 0,15	22,45 ± 0,10	4,13 ± 0,18	17,45 ± 2,23	***
U937	30,07 ± 0,58	26,91 ± 0,31	1,79 ± 0,35	3,46 ± 0,84	***
HepG2	25,62 ± 0,28	24,91 ± 0,13	0,70 ± 0,31	1,63 ± 0,35	*
Hek293	24,02 ± 0,14	22,33 ± 0,04	1,69 ± 0,14	3,22 ± 0,32	***
2102KLE	26,52 ± 0,48	24,71 ± 0,08	1,80 ± 0,49	3,49 ± 1,18	**
2102	23,47 ± 0,22	23,09 ± 0,04	0,38 ± 0,23	1,30 ± 0,21	*
T24	27,88 ± 0,19	25,00 ± 0,08	2,88 ± 0,21	7,38 ± 1,06	***
MCF7	25,13 ± 0,36	22,70 ± 0,02	2,43 ± 0,36	5,37 ± 1,33	***
NW1539	26,33 ± 0,18	24,92 ± 0,26	1,41 ± 0,31	2,66 ± 0,58	**
A2780cis	25,32 ± 0,11	22,10 ± 0,02	3,22 ± 0,11	9,30 ± 0,70	***
K562	30,45 ± 0,46	29,81 ± 0,03	0,64 ± 0,46	1,56 ± 0,50	n. s.
HT29	25,23 ± 0,10	26,07 ± 0,10	-0,84 ± 0,14	0,56 ± 0,05	***
Caco2	28,56 ± 0,11	27,36 ± 0,02	1,20 ± 0,11	2,29 ± 0,18	***
Cal27res	24,60 ± 0,53	23,36 ± 0,37	1,24 ± 0,64	2,36 ± 1,05	*

Fortsetzung Tabelle 12.4

RPL5

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	19,72 ± 0,05	21,88 ± 0,49	-2,16 ± 0,49	0,22 ± 0,08	**
1321N1	20,13 ± 0,29	19,46 ± 0,08	0,67 ± 0,30	1,59 ± 0,34	*
Cal27	20,27 ± 0,64	19,67 ± 0,24	0,61 ± 0,67	1,52 ± 0,72	n. s.
DU145	23,71 ± 0,31	21,26 ± 0,22	2,45 ± 0,37	5,45 ± 1,42	***
A2780	18,03 ± 0,42	16,76 ± 0,03	1,27 ± 0,42	2,41 ± 0,71	**
U937	19,82 ± 0,34	17,45 ± 0,07	1,79 ± 0,35	3,46 ± 0,84	***
HepG2	16,87 ± 0,36	18,42 ± 0,10	-1,55 ± 0,37	0,34 ± 0,09	**
Hek293	16,50 ± 0,04	15,81 ± 0,28	0,69 ± 0,28	1,61 ± 0,31	*
2102KLE	20,91 ± 0,04	19,53 ± 0,05	1,38 ± 0,07	2,61 ± 0,12	***
2102	16,42 ± 0,34	17,38 ± 0,14	-0,96 ± 0,37	0,51 ± 0,13	*
T24	20,53 ± 0,25	19,15 ± 0,33	1,39 ± 0,41	2,61 ± 0,75	**
MCF7	20,10 ± 0,45	19,39 ± 0,20	0,71 ± 0,49	1,63 ± 0,56	n. s.
NW1539	23,03 ± 0,25	22,73 ± 0,08	0,30 ± 0,26	1,23 ± 0,22	n. s.
A2780cis	18,23 ± 0,34	15,99 ± 0,29	2,24 ± 0,49	4,73 ± 1,47	***
K562	19,55 ± 0,09	20,23 ± 0,07	-0,68 ± 0,12	0,62 ± 0,05	***
HT29	17,27 ± 0,28	19,73 ± 0,08	-2,47 ± 0,29	0,18 ± 0,04	***
Caco2	18,38 ± 0,19	18,52 ± 0,32	-0,14 ± 0,37	0,91 ± 0,23	n. s.
Cal27res	21,85 ± 0,04	22,23 ± 0,02	-0,38 ± 0,05	0,77 ± 0,03	***

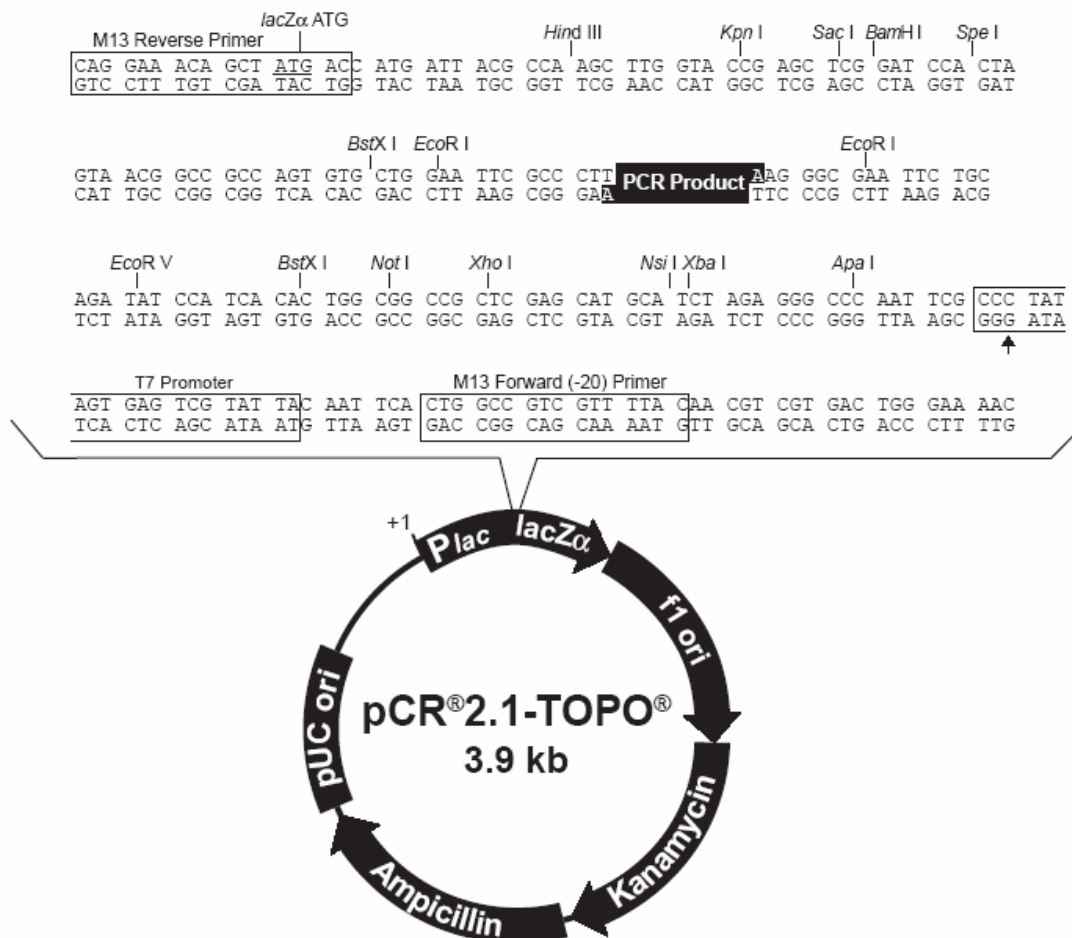
THBS1

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
Kyse510	23,62 ± 0,46	20,82 ± 0,14	2,80 ± 0,49	6,97 ± 2,34	***
1321N1	28,45 ± 0,30	26,10 ± 0,22	2,35 ± 0,37	5,11 ± 1,31	***
Cal27	21,40 ± 0,26	16,47 ± 0,16	4,93 ± 0,31	30,40 ± 6,49	***
DU145	30,89 ± 0,30	28,38 ± 0,41	2,51 ± 0,51	5,71 ± 2,01	**
A2780	32,31 ± 0,32	25,16 ± 0,55	7,15 ± 0,63	141,49 ± 62,01	***
U937	-	-	-	-	-
HepG2	25,09 ± 0,29	26,18 ± 0,20	-1,09 ± 0,35	0,47 ± 0,11	**
Hek293	31,87 ± 0,07	31,94 ± 0,53	-0,07 ± 0,54	0,96 ± 0,36	n. s.

	C_T(korr.) ± SD unbehandelt	C_T(korr.) ± SD behandelt	Δ CT	Expressi- onsfaktor	Signifi- kanz
2102KLE	30,21 ± 0,28	26,87 ± 0,11	3,34 ± 0,30	10,15 ± 2,13	***
2102	26,57 ± 0,61	24,27 ± 0,19	2,31 ± 0,64	4,95 ± 2,21	**
T24	23,60 ± 0,29	21,13 ± 0,01	2,47 ± 0,29	5,52 ± 1,11	***
MCF7	28,54 ± 0,51	25,81 ± 0,27	2,73 ± 0,58	6,62 ± 2,65	**
NW1539	22,89 ± 0,08	21,59 ± 0,11	1,30 ± 0,13	2,47 ± 0,23	***
A2780cis	37,43 ± 0,18	31,35 ± 0,42	6,08 ± 0,46	67,60 ± 21,37	***
K562	31,38 ± 0,06	25,99 ± 0,24	5,40 ± 0,25	42,15 ± 7,27	***
HT29	30,15 ± 0,12	28,39 ± 0,13	1,76 ± 0,17	3,38 ± 0,4	***
Caco2	24,71 ± 0,18	26,83 ± 0,42	-2,12 ± 0,46	0,23 ± 0,07	**
Cal27res	19,89 ± 0,28	20,00 ± 0,63	-0,11 ± 0,69	0,93 ± 0,45	n. s.

12.4 Vektorkarten

12.4.1 pCR®2.1-TOPO®



Comments for pCR®2.1-TOPO®

3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547

M13 reverse priming site: bases 205-221

Multiple cloning site: bases 234-357

T7 promoter/priming site: bases 364-383

M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406

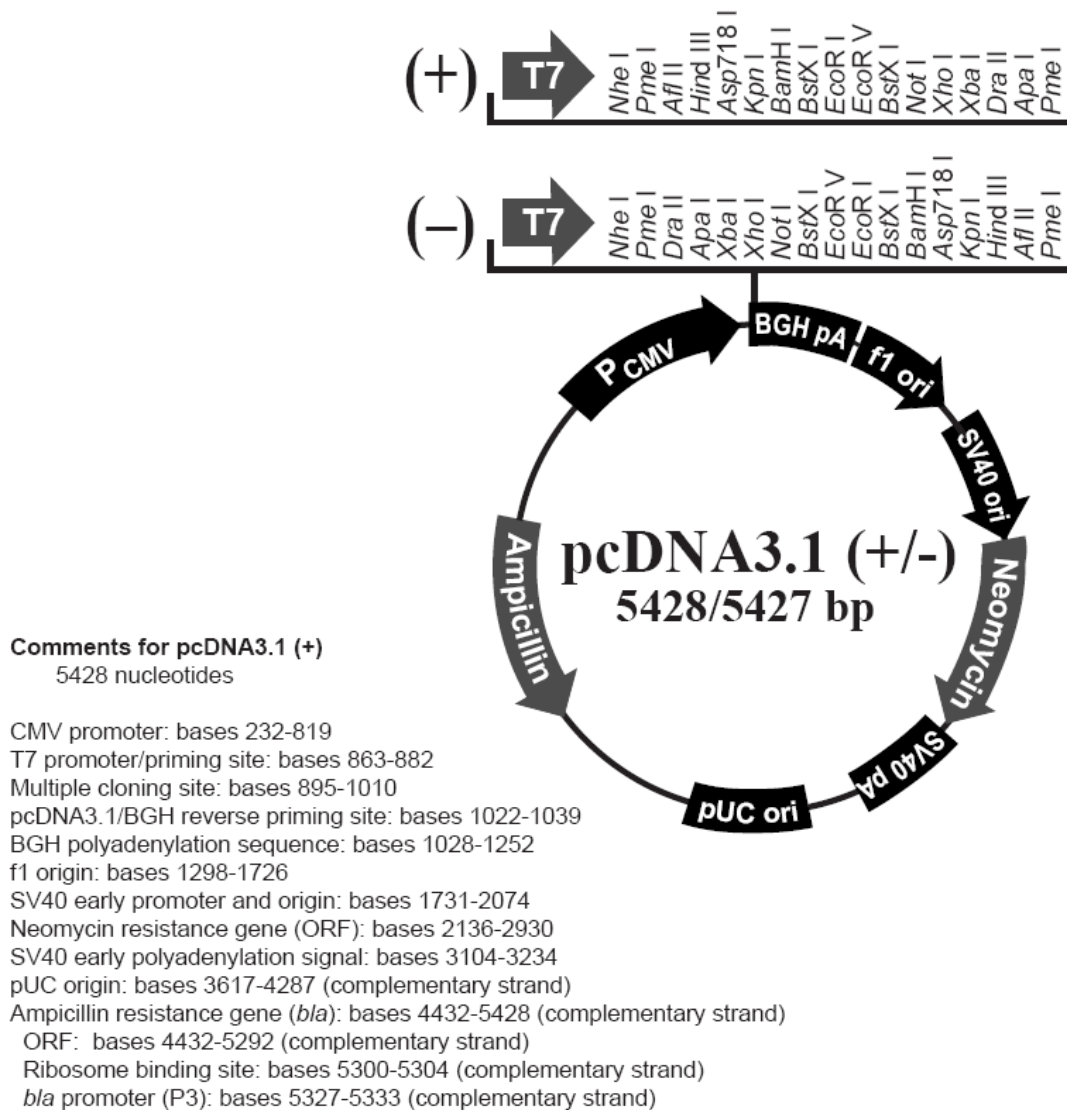
f1 origin: bases 548-985

Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113

Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991

pUC origin: bases 3136-3809

12.4.2 pcDNA3.1



12.5 Genotypen der verwendeten E. coli

TOPO10F'

$F'\{lacI^qTn10(Tet^R)\}mcrA\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)\phi80/lacZ\Delta M15\Delta/lacX74$
 $recA1araD139\Delta(ara-leu)7697galUgalKrpsL(Str^R)endA1nupG$

